

Etablierung eines molekularen Schnelltests zum Nachweis  
von *Mycobacterium avium* subspezies *paratuberculosis*  
mittels PCR und Real-Time PCR

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom Biologin  
Sabine Andrea Platz (geb. Kraft)

geboren am 14.07.1975 in Kassel

Things should be made as simple as possible, but not any simpler.

*Albert Einstein (1879-1955)*

Gutachter:

Prof. Dr. Johannes Wöstemeyer, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Prof. Dr. Wolfgang Nellen, Universität Kassel

Prof. Dr. Erika Kothe, Friedrich-Schiller-Universität Jena

Tag der Verteidigung: 10.08.2009

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

Sabine A. Kraft und Wulf-Iwo Bock (2003)

Qualitativer und quantitativer Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) mittels PCR aus künstlich kontaminierter Milch.

*Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG); 25. Kongress der DVG, Berlin*

Sabine A. Kraft und Wulf-Iwo Bock (2003)

Erfahrungen mit der Aufreinigung von DNA aus Milch und quantitativer Nachweis *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* mit einem Real-Time-Assay

*2. Arbeitstagung des nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabors für Tuberkulose und des Referenzlabors für Paratuberkulose, Jena*

Sabine A. Kraft, M. N. Ebert, C. Seyboldt (2005)

Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* aus Rohmilch mittels eines automatisierten Testkitsystems.

*Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG); Arbeitskreis für veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik (AVID), Bad Staffelstein*

Sabine A. Kraft, M. N. Ebert, C. Seyboldt (2006)

Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* aus Rohmilch mittels eines automatisierten Testkitsystems.

*Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG); Tagung der Fachgruppe „Bakteriologie und Mykologie“, Wetzlar*

Diese Arbeit wurde durch das Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie (Projektnummer 77/00) und das Bundesministerium für Wirtschaft und Arbeit (Projektnummer 194/03) finanziell gefördert.

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>6</b>
1.1. Die Paratuberkulose des Rindes .....	6
1.1.1. Pathogenese .....	6
1.1.2. Krankheitsbild .....	7
1.1.3. Immunantwort des Rindes .....	7
1.1.4. Wirtschaftliche Bedeutung .....	7
1.2. Der Erreger .....	9
1.2.1. Charakteristika und Klassifizierung .....	9
1.2.2. Zellwandstruktur .....	9
1.2.3. Tenazität .....	10
1.2.4. Genetische Merkmale .....	11
1.3. Morbus Crohn und <i>Mycobacterium paratuberculosis</i> .....	12
1.4. Diagnose der Paratuberkulose .....	14
1.4.1. Tests zur direkten Identifizierung .....	14
1.4.2. Tests zur indirekten Identifizierung .....	17
1.5. DNA-Nachweis von <i>Mycobacterium paratuberculosis</i> .....	20
1.5.1. Möglichkeiten zur DNA-Isolation vom Mykobakterien .....	20
1.5.2. PCR-Nachweis von <i>Mycobacterium paratuberculosis</i> aus Milch ...	21
1.5.3. Problematik des PCR-Nachweises aus Lebensmitteln .....	23
1.6. Grundlagen der Real-Time PCR .....	26
1.6.1. Chemische Grundlagen .....	26
1.6.2. GeneAmp 5700 Sequence Detection System .....	29
<b>2. METHODEN .....</b>	<b>30</b>
2.1. Anlegen und Pflege einer Stammsammlung .....	30
2.1.1. Kultivierung von Bakterien .....	30
2.1.2. Konservierung von <i>Mycobacterium paratuberculosis</i> .....	30
2.1.3. Ziehl-Neelsen-Färbung .....	30
2.2. Methoden zur Isolierung von Nukleinsäuren .....	31
2.2.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	31
2.2.2. Phenol/Chloroformextraktion und Ethanol-fällung von DNA .....	31
2.2.3. Analyse von Nukleinsäuren durch Agarose-Gelelektrophorese ....	32
2.2.4. Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen .....	32
2.2.5. Isolierung von DNA aus Kultur .....	33
2.2.6. Isolierung von DNA aus Milch .....	35
2.3. Festlegung der PCR Parameter .....	45
2.4. Analyse vorhandener Testverfahren .....	46
2.5. Experimente zur Real-Time-PCR .....	49

<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>52</b>
3.1. Anlegen und Pflege einer Stammsammlung.....	52
3.2. Methoden zur Isolierung von Nukleinsäuren.....	54
3.2.1. Isolierung von DNA aus Kultur .....	54
3.2.2. Isolierung von DNA aus Milch .....	55
3.3. Optimierung der PCR – Ermittlung Spezifität und Sensitivität .....	66
3.4. Analyse vorhandener Testverfahren.....	68
3.5. Feldstudien .....	71
3.6. Experimente zur Real-Time-PCR .....	75
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>89</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>100</b>
<b>6. SUMMARY .....</b>	<b>101</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>102</b>
<b>8. ANHANG.....</b>	<b>119</b>
8.1. Sequenz IS900 .....	119
8.2. Vektor .....	121
8.3. Material.....	123
8.3.1. Geräte .....	123
8.3.2. Verbrauchsmaterialien.....	124
8.3.3. Chemikalien.....	125
8.3.4. Organismen und Antikörper.....	128
8.3.5. Primer.....	128
8.3.6. Größenstandards.....	130
8.4. Abkürzungen .....	130
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>133</b>
<b>EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....</b>	<b>134</b>

## 1. Einleitung

### 1.1. Die Paratuberkulose des Rindes

Die Paratuberkulose ist eine chronische Darmentzündung bei Wiederkäuern, welche durch den intrazellulären Erreger *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (*M. paratuberculosis*) verursacht wird. Die Infektion tritt meist bei Kälbern auf und ist durch eine lange subklinische Phase (2-3 Jahre) gekennzeichnet, in der die Krankheit meist unbemerkt bleibt. Klinische Symptome sind Gewichtsverlust, wässriger Durchfall, raues Haarkleid und letztlich der Tod [COCITO *et al.*, 1994; STABEL, 1998].

In Deutschland ist die Paratuberkulose eine meldepflichtige Erkrankung. Vom *Office International des Epizooties* (OIE) wird die Paratuberkulose als Liste B-Erkrankung geführt. Damit wird sie sowohl als eine Erkrankung mit sozioökonomischem Einfluss, als auch mit Bedeutung für die menschliche Gesundheit eingestuft.

#### 1.1.1. Pathogenese

Jungtiere infizieren sich meist über Kot, Milch oder Kolostrum, welches mit *M. paratuberculosis* kontaminiert ist [CHIODINI *et al.*, 1984; RUZANTE *et al.*, 2008; NIELSEN *et al.*, 2008]. Die Erreger gelangen in den Darm, wo sie über die M-Zellen der Peyerschen Platten die Darmschleimhaut überwinden, ähnlich wie andere intrazelluläre Pathogene, z.B. Salmonellen [MOMOTANI *et al.*, 1988]. *M. paratuberculosis* wird dort von Makrophagen aufgenommen, in denen die Bakterien lange überleben und sich vermehren.

Beim intrazellulären Wachstum sterben die Makrophagen ab, die Erreger werden freigesetzt und erneut phagozytiert. Die Infektion breitet sich im Dünndarm aus und befällt großflächige Regionen sowie angrenzende Körperbereiche wie Leber, Milz und Niere. Später werden die epitheloiden Zellen ins Darmlumen abgestreift und die Mykobakterien werden mit dem Kot, der Milch und dem Kolostrum ausgeschieden. Die Zellzahlen liegen bei  $10^8$  Zellen/g Kot bzw.  $10^{12}$  Zellen/Tag [CHIODINI *et al.*, 1984].

### 1.1.2. Krankheitsbild

Erkrankte Rinder leiden an einer Proteinmangel-Enteropathie, pathologisch-histologisch zeigt sich eine granulomatöse Entzündung der Dünndarmschleimhaut und der Mesenteriallymphknoten. Die Tiere zeigen intermittierenden Durchfall mit wässrigem und übelriechendem Kot, während die Fresslust erhalten bleibt. Im späten Stadium der Krankheit ist der Kot ausschließlich dünnflüssig und mit Gasblasen durchsetzt. Nach überwiegend jahrelangem Siechtum endet Paratuberkulose immer mit dem Tod [ROSENBERGER, 1978].

### 1.1.3. Immunantwort des Rindes

Natürlich infizierte Rinder entwickeln eine humorale Immunantwort gegen *M. paratuberculosis*, es werden Antikörper der Klassen IgG und IgM, nicht aber IgA nachgewiesen [ABBAS und RIEMANN, 1988]. Die zelluläre Immunantwort in Form von proliferierenden  $\gamma/\delta$ -T Lymphozyten überwiegt jedoch [CHIODINI und DAVIS, 1992]; die Autoren vermuten, dass die Empfänglichkeit der Rinder für die Infektion mit *M. paratuberculosis* aus der zytotoxischen Eliminierung antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen durch entsprechende  $\gamma/\delta$ -T Zellen resultiert. Beim Fortschreiten der Krankheit vom subklinischen ins klinische Stadium wird die Zell-Vermittelte Immunantwort zur Antigenstimulation geringer und durch eine starke humorale Immunantwort ersetzt [BENDIXEN, 1977].

### 1.1.4. Wirtschaftliche Bedeutung

Die wirtschaftlichen Verluste durch Rückgang der Milchleistung, Abmagern und vorzeitigen Abgang der Tiere sind erheblich. Nach Schätzungen des National Animal Health Monitoring System von 1996 sind 20 - 40 % der US Milchviehherden mit *M. paratuberculosis* infiziert [WELLS *et al.*, 1998]. Dies führt zu geschätzten Verlusten bei der US Milchwirtschaft von 220 Millionen US \$ im Jahr [OTT *et al.*, 1999]. Für die Kanadische Milchindustrie wurden jährliche Verluste von 1196 \$ pro 100 Kühe berechnet [TIWARI *et al.*, 2008]. Berechnungen aus den USA bzw. Niederlanden nennen jährliche Einbußen von 1,5 Milliarden Dollar, bzw. 25 Millionen Gulden [HAMMER *et al.*, 2000].

In Thüringen ist Paratuberkulose erstmals 1996 in einer Mutterkuhherde beobachtet worden. 1999 waren bereits 28 Rinderherden von dieser Erkrankung betroffen, eine hohe Dunkelziffer wird vermutet. Eine Untersuchung vom Tiergesundheitsdienst e.V. ergab, dass 30 % der Thüringer Milchviehbestände mit Paratuberkulose infiziert sind, fast zwei Drittel der Betriebe sind als verdächtig eingestuft und etwa 5 % der Betriebe sicher nicht infiziert. [Bericht zur Tierseuchenbekämpfung]. Über das Vorkommen in den anderen Bundesländern liegen nur unvollständige Daten vor. Fachleute schätzen, dass wenigstens 10 bis 15 % der Milchviehherden betroffen sind. In Studien aus anderen Ländern der EU (z. B. Dänemark und Niederlanden) sind Befallsraten von 35 bis über 60 % ermittelt worden [HAMMER *et al.*, 2000].

MERKAL *et al.* (1987) wiesen *M. paratuberculosis* in 116 (1,6 %) von 7540 klinisch unauffälligen, geschlachteten Rindern aus fast allen Staaten der USA durch kulturelle Untersuchung der Ileocaecallymphknoten nach. Für Milchvieh wurde die Prävalenz mit 2,9 %, für Mastvieh mit 0,8 % angegeben. CHIODINI und VAN KRUIJNINGEN (1983) gaben auf Grund einer Stichprobenuntersuchung in New England sogar 18 % aller geschlachteten Rinder als mit *M. paratuberculosis* infiziert an.

Die Mortalität kann in stark befallenen Herden auf bis zu 25 % ansteigen [DOYLE, 1956], die Totalverluste sind jedoch wirtschaftlich nicht so bedeutsam wie die Schäden in subklinischen Fällen. Subklinisch an Paratuberkulose erkrankte Rinder verursachen durch eine geringere Milchleistung und vermehrte Infertilität wirtschaftliche Verluste [HUTCHINSON, 1996]. So produzieren erkrankte Kühe im Durchschnitt 15 % weniger Milch als nicht infizierte Kühe. Subklinisch infizierte Rinder produzieren durchschnittlich 5 bis 15 % weniger Milch [RIEMANN und ABBAS, 1983; WILSON *et al.*, 1993]. Die Erkrankung nimmt auch Einfluss auf die Inhaltsstoffe der Milch. So betrug der Rückgang des Fett- und Proteingehalts in der Milch 21 % für klinisch erkrankte und 17,5 % für subklinisch erkrankte Rinder [BENEDICTUS *et al.*, 1987].



## 1.2. Der Erreger

### 1.2.1. Charakteristika und Klassifizierung

*M. paratuberculosis* ist ein 0,3 - 0,2 x 0,3 - 0,5 µm großes gram-positives, unbewegliches und obligat aerobes Stäbchen [BISPING und AMTSBERG, 1988].

Charakteristisch für *M. paratuberculosis* ist das langsame, mycobactin-abhängige Wachstum. Mycobactin ist ein zellwandassoziiertes Siderophor, das von allen Mykobakterien, mit Ausnahme von *M. leprae* und *M. paratuberculosis*, synthetisiert wird [WHEELER und RATLEDGE, 1994]. Bei einer Generationszeit von 1,3 bis 4,4 Tagen werden sichtbare Kolonien auf festen Nährböden erst nach 8-12 Wochen erwartet [LAMBRECHT *et al.*, 1988].

Taxonomisch wird *Mycobacterium paratuberculosis* zur Ordnung der *Actinomycetales* und zur Familie der *Mycobacteriaceae* gezählt. Auf Grund von biochemischen Charakteristika wird der Erreger als weitere Subspezies (subsp.) von *Mycobacterium avium*, neben *M. avium* subsp. *silvaticum*, *M. avium* subsp. *hominissuis* und *M. avium* subsp. *avium*, klassifiziert [THOREL *et al.*, 1990].

THOREL *et al.* (1990) charakterisierten *M. paratuberculosis* als kurze bis lange Stäbchen ohne Bildung von Fäden mit Mycobactin abhängigem Wachstum. *M. paratuberculosis* produziert kein Niazin und es fehlen Peroxidase, Nitratreduktase, Urease, Arylsulfatase, Penicillinase und  $\beta$ -Glukosidase. Es findet keine Hydrolyse von Tween 80 innerhalb von 10 Tagen statt, der Erreger produziert aber geringe Mengen thermoresistenter Katalase.

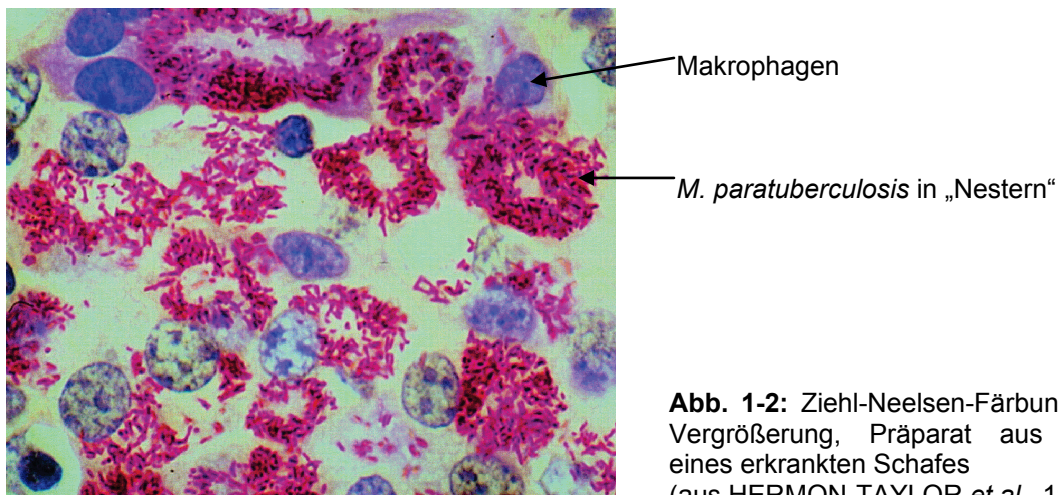
*M. paratuberculosis* wächst auf Eidotternährböden (Herold's egg yolk medium und Loewenstein-Jensen Medium) oder Middlebrook Agar. Durch Pyruvat Zugabe kann das Wachstum stimuliert werden, nicht aber durch eine pH-Wert Absenkung des Mediums von unter pH 5,5. Es verfügt über Resistenzen gegenüber Thiophen-2-carboxylsäurehydrazid und Isoniazid.

### 1.2.2. Zellwandstruktur

Die mykobakterielle Zellwand besteht aus außen liegenden Mycolsäuren, die mit verzweigten Arabinogalaktanketten ein lipophiles Arabinogalaktan-Mycolat bil-

den. Dieses verankert sich am Peptidoglykan der Mureinbasalstruktur und ist für die hohe Tenazität verantwortlich [SCHLIESSER, 1985]. Zusätzlich enthält sie einen großen Teil langkettiger Mykolsäuren, wodurch die Zellwand eine außerordentliche Resistenz gegenüber Säuren und Laugen besitzt.

Mit der Ziehl-Neelsen-Färbung, einer Methode zur selektiven Anfärbung säurefester Bakterien, macht man sich diese Eigenschaft zunutze. Eine weitere Möglichkeit zur Färbung ist die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen wie Auramin O-Rhodamin [TRUANT *et al.*, 1962] und Phenol-Acridinorange [SMITHWICK *et al.*, 1995]. Im mikroskopischen Bild zeigen sich die Mykobakterien in nesterartigen Gruppierungen, die vermutlich durch die Ausbildung interzellulärer Filamente zustande kommen [MERKAL *et al.*, 1973]. Es werden bei dieser Methode allerdings auch andere Mykobakterien angefärbt und die histologische Differenzierung ist so nicht möglich [COETSIER *et al.*, 1998].



**Abb. 1-2:** Ziehl-Neelsen-Färbung, 1600 fache Vergrößerung, Präparat aus Lymphknoten eines erkrankten Schafes (aus HERMON-TAYLOR *et al.*, 1998)

### 1.2.3. Tenazität

Auf Grund seiner Zellwandstruktur besitzt *M. paratuberculosis* eine hohe Tenazität. Der Erreger überlebt im Weidekot infizierter Tiere mehrere Monate [ROSENBERGER, 1978] und ist noch nach 270 Tagen aus stehenden Gewässern zu isolieren [LARSEN *et al.*, 1956]. In der Gülle können die Erreger bis neun Monate überleben. Von den Weiden können die Erreger mit dem Regen in Flüsse, Seen und in Systeme zur Trinkwasserversorgung eingetragen werden [JORGENSEN, 1977].

Eine Vielzahl von Untersuchungen belegt zudem, dass *Mycobacterium paratuberculosis* in der Milch so hitzeresistent ist, dass es eine Pasteurisierung bei 71 °C und 15 Sekunden Einwirkdauer in der Molkerei infektiös überlebt [GRANT *et al.*, 1996; STABEL *et al.*, 1997; SUNG und COLLINS, 1998].

Der Erfolg der Pasteurisierung ist dabei sehr vom Anfangskeimgehalt der Milch und der Einwirkdauer abhängig [SUNG und COLLINS, 1998; CERF *et al.* 2007]. Nach SUNG und COLLINS, 1998 scheidet eine an Paratuberkulose erkrankte Kuh ca.  $10^7$  Millionen Mykobakterien pro Gramm Kot aus. So sind nach diesen Untersuchungen sehr häufig mehr als 10 Keime/ml Milch vorhanden, sodass die übliche Erhitzungsdauer von 15 Sekunden nicht ausreicht. Es kann nur mit einer Keimreduzierung gerechnet werden [MEYLAN *et al.*, 1996].

In Australien gelang es sogar *M. paratuberculosis* aus Milch anzuzüchten, die für 15 Sekunden auf 82 °C erhitzt wurde [HOPE *et al.*, 1996]. In der Bundesrepublik wird entsprechend der Milchverordnung [Milchverordnung, 1995] für 15 bis 30 Sekunden auf 72 bis 75 °C erhitzt. Unter diesem Aspekt erscheinen Rohmilch und Rohmilchkäse, die von Einzelbetrieben vermarktet werden, als besonders risikobehaftet. Hier können große Mengen *M. paratuberculosis* Erreger über Rohmilch und Rohmilchkäse direkt an den Verbraucher gehen, da der Verdünnungseffekt und das Pasteurisieren durch die Molkerei entfallen.

#### **1.2.4. Genetische Merkmale**

*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* ist eng mit den Mitgliedern des *Mycobacterium avium* Komplexes verwandt. Über den Nachweis des spezifischen Insertionselementes IS900 (1,451 kb), das in 15-20 Kopien im *M. paratuberculosis* - Genom vorliegt [MC FADDEN *et al.*, 1987; GREEN *et al.*, 1989; NASER *et al.* 1998], kann der Erreger von anderen Mykobakterien unterschieden werden.

In verschiedenen Arbeiten wurde mit Hilfe von IS900 *M. paratuberculosis* identifiziert [MILLAR *et al.*, 1996; BAUERFEIND *et al.*, 1996; WHITTINGTON *et al.*, 1998]. Im Gegensatz zu anderen klassischen Insertionselementen fehlen bei IS900 invertierte terminale Wiederholungen, es generiert auch keine direkten Wiederholungen bei seiner Ziel-DNA. IS900 kommt nur bei *M. paratuberculosis*

vor und kodiert auf einem Strang für die 399 aa putative Transposase p43. Auf dem komplementären Strang kodiert es für das sogenannte *hed* Protein, dessen Funktion noch unbekannt ist. Es inseriert nur in eine Richtung in hoch konservativen Regionen von Consensus-Zielsequenzen [BULL *et al.*, 2000]. In einer Studie von BULL *et al.*, 2000 wurden 14 verschiedene IS900 Loci und deren flankierende Gene charakterisiert. Dabei wiesen 13 Loci eine 94-100 % Homologie zu *M. avium* subsp. *avium* auf, was die enge Verwandtschaft zum *M. avium* Komplex betont.

Durch die Insertion von IS900 kommt es in einigen Loci zur Basensubstitution. Gene die, wenn sie überhaupt bekannt sind, von dieser Substitution beeinflusst werden, sind z. B. O-6-methylguanine methyltransferase (*ogt*) auf Locus 9 und ein PE/PGRS tandem-repeat Protein auf Locus 14. Die Funktion von PE/PGRS steht in Verbindung zur Antigenvariation bei *M. tuberculosis* [COLE *et al.*, 1998], während *ogt* eine Hauptkomponente der adaptiven Antwort auf *intracellular killing* in Mykobakterien ist [LINDAHL *et al.*, 1988].

Ein 3,2 kb *Bam*HI-Fragment, das IS900 enthält, wurde in *M. smegmatis* kloniert [NASER *et al.*, 1998]. Daraufhin zeigte sich, dass der rekombinante *M. smegmatis* Stamm nur noch sehr schlecht und langsam wächst. Durch die Zugabe von Mycobactin konnte dies aufgehoben werden. Normalerweise benötigt *M. smegmatis* kein Mycobactin zum Wachstum, diese Eigenschaft besitzt ausschließlich *M. paratuberculosis*. Deshalb wird vermutet, dass IS900 den nativen Syntheseweg für Mycobactin in *M. smegmatis* unterdrückt, wobei IS900 möglicherweise als ein Repressor des Mycobactinoperons agiert [NASER *et al.*, 1998].

### **1.3. Morbus Crohn und *Mycobacterium paratuberculosis***

In Lehrbuch „Innere Medizin“ von Stobbe und Baumann (1996) wird Morbus Crohn folgendermaßen charakterisiert: „Beim Morbus Crohn handelt es sich um eine chronische Entzündung, die den gesamten Verdauungskanal befallen kann. Das Endileum ist am häufigsten und sehr oft zuerst betroffen, gefolgt vom Dickdarm (granulomatöse Kolitis); selten sind Ösophagus, Magen und Duodenum beteiligt. Die Ursache ist noch ungeklärt. Familiäres Vorkommen lässt eine gene-

tische Disposition vermuten. Es mehren sich Hinweise, dass *Mycobacterium paratuberculosis* als Erreger in Betracht kommt. Infektionen mit *M. paratuberculosis* sind in Rinderbeständen verbreitet; als Infektionsweg wird der Genuss von Kuhmilch angenommen.

Pathologisch-anatomisch handelt es sich um zunächst subepithelial gelegene Epitheloid-zellgranulome mit sekundärer Ulzeration der Mukosa. Charakteristisch ist die Tendenz zu narbiger Schrumpfung und Verkürzung des Mesenteriums und divertikel-ähnlichen Erweiterungen des Darms auf der gegenüber liegenden Seite, ferner die Neigung zur Fistelbildung. Die Fisteln verbinden verschiedene Darmabschnitte miteinander, können in andere Hohlorgane penetrieren oder sich nach außen öffnen. Symptome sind allgemeine Entzündungszeichen, krampfartige oder dumpfe Schmerzen zumeist im rechten unteren Quadranten, auch periumbilikal, Krankheitsgefühl, mäßige Diarrhoe, die selten blutig ist.“ [STOBBE/BAUMANN, 1996].

In einer Reihe von Untersuchungen konnte der Subtyp von *Mycobacterium paratuberculosis*, der bei Rindern zu finden ist, eindeutig auch bei Morbus Crohn identifiziert werden [HERMON-TAYLOR *et al.*, 1998; PAVLÍK *et al.*, 1995]. Ein Zusammenhang wird insgesamt jedoch sehr kontrovers diskutiert. Verschiedene Untersucher sehen keinen Beleg [ROWBOTHAM *et al.*, 1995; TANAKA *et al.*, 1991] für eine ursächliche Beteiligung von *M. paratuberculosis* an der Entstehung von Morbus Crohn.

Weitere Untersuchungen lassen keine Interpretation [WADELL *et al.*, 2008; GITNICK *et al.*, 1998; GRAHAM *et al.*, 1987] in die eine oder andere Richtung zu und wiederum andere Untersuchungen werden von den Verfassern so interpretiert, dass ein eindeutiger Zusammenhang [FRANCOIS *et al.*, 1997; SANDERSON *et al.*, 1993; WALL *et al.*, 1993] zu sehen ist.

Im Fall der Morbus Crohn Erkrankung ist es selten gelungen, *M. paratuberculosis* kulturell nachzuweisen. In der PCR-Untersuchung konnte aber das *M. paratu-*

*berculosis* spezifische Element IS900 nachgewiesen werden [PAVLÍK *et al.*, 1995, FRANCOIS *et al.*, 1997; SANDERSON *et al.*, 1993; WALL *et al.*, 1993].

Auch zeigen Untersuchungen das *M. paratuberculosis* bei Morbus Crohn Patienten als Zellwand-freie Form (Sphäroblast) vorliegen kann [CHIODINI *et al.*, 1986; MARKESICH *et al.*, 1988]. Dadurch scheint der Erreger seine Säurefestigkeit zu verlieren, wodurch er nicht mehr anfärbbar ist. Eine IS900 PCR identifiziert ihn aber als *M. paratuberculosis* [WALL S. *et al.* 1993]. Zudem weisen M. Crohn Patienten einen erhöhten *M. paratuberculosis* Antikörpertiter im Vergleich mit Kontrollen und Patienten mit Colitis ulcerosa auf [THAYER, W.R. *et al.* 1984].

## **1.4. Diagnose der Paratuberkulose**

### **1.4.1. Tests zur direkten Identifizierung**

#### Ziehl-Neelsen-Färbung von Kotaustriichen

Die mikroskopische Identifizierung des Erregers im Kot der infizierten Tiere ist schnell, billig und einfach. Hierzu wird die Ziehl-Neelsen-Färbung verwendet, als positives Ergebnis gilt der Nachweis von kleinen, säure-festen Stäbchen in Haufen/Klumpen (drei oder mehr). Der Test ist zur präklinischen Diagnostik nicht geeignet, kann aber zur Diagnose im klinischen Fall verwendet werden. Dabei zeigt sich bei der Begutachtung nur eines Ausstrichs pro Tier einer von drei klinisch positiven Fällen im Mikroskop positiv [OIE, 1996]. Bei Unerfahrenheit des Begutachters können zudem andere säure-feste Bakterien zu falsch-positiven Ergebnissen führen. Dieser Test hat daher eine geringe Sensitivität und Spezifität, die stark vom Begutachter abhängig ist.

#### Kotkultur

Der kulturelle Nachweis des Erregers aus Kot gilt als „Goldstandard“ zum Nachweis der Paratuberkulose in der subklinischen Phase [STABEL *et al.*, 2002; COETSIER *et al.*, 2000]. Es wird allgemein von einer Spezifität von 100 % ausgegangen, wenn die Isolate mittels PCR überprüft wurden. Die genaue Angabe

der Spezifität bleibt dennoch ein Problem, da es keine allgemein gültigen Protokolle zur Aufarbeitung des Kots gibt.

Auch Pilzkontaminationen, die die Kultur überwachsen können, stellen ein großes Problem dar. Zudem verändert sich die Ausscheidungsrate des Erregers, es kann vorkommen, dass die Anzahl der ausgeschiedenen Erreger unter die Nachweisgrenze der Kotkultur fällt. Mindestens  $10^2$  vermehrungsfähige Keime/g Kot müssen für den kulturellen Nachweis vorhanden sein.

Eine Sensitivität von ca. 50 % wird allgemein angenommen, aber auch Raten von über 60 % für Tiere in der subklinischen Phase wurden beobachtet [SOCKETT *et al.*, 1992a]. Für klinische Fälle wurde eine überraschend niedrige Rate von nur 70 % beobachtet [EGAN *et al.*, 1999]. Die Erfolgsvariationen spiegeln den Mangel an der Standardisierung von z. B. der Dekontaminationsmethode des Kots oder den Medienzusätzen wieder. Zudem ist die Technik mit traditionellen Kulturmethode auf Festmedium sehr zeitaufwendig und kann bis zu 10 Monate dauern [WHIPPLE *et al.*, 1991].

Das Wachstum von *M. paratuberculosis* wird zum Teil auch durch den Dekontaminationsprozess gehemmt, der für die Kultur essentiell ist und verhindert, dass das Medium von schnell wachsenden Organismen überwuchert wird. Das Ausschütteln des Kots mit Hexadecylpyridiniumchlorid (HPC) ist eine der effizientesten Dekontaminationsmethoden um die Begleitflora abzutöten. Eine Alternative ist Oxalsäure und NaOH in Zusammenhang mit der Verwendung von Löwentstein-Jenssen Medium.

Eine alternative Technik für die Isolierung von *M. paratuberculosis* ist das BACTEC System. Dieses basiert auf einem Flüssigkulturmedium das einen radioisotop-markierten Nährstoff enthält ( $\text{CO}_2$  markiertes Palmitat) [Collins *et al.*, 1990]. Ein spezielles Instrument (BACTEC 460) liest die Resultate durch eine Messung der Carbon-14 markierten  $\text{CO}_2$ -Freisetzung durch das metabolisierte Substrat. Das BACTEC System in Zusammenhang mit einer Filterkonzentration des Kots ist in der Lage, positive Proben in der Hälfte der Zeit zu identifizieren

und ist sensitiver als die herkömmlichen Kulturtechniken [Collins *et al.*, 1996]. Da der Test aber auf einer Radiometrischen Messung basiert und ein spezielles Gerät erforderlich ist, wird diese Technik nur von wenigen Laboren durchgeführt. Zudem ist das Problem, dass die Kultur von schnell wachsenden Mikroorganismen überwuchert werden kann, noch nicht gelöst.

Der Bakterielle Nachweis von *M. paratuberculosis* als eine diagnostische Methode hat einige Vorteile. Positive Ergebnisse in der Kotkultur korrelieren sehr gut mit der Ausscheidung des Organismus in Kolostrum oder Milch, sowie der Transmission der Infektion *in utero* [WHIPPLE *et al.*, 1992]. Infizierte Tiere können aus der Herde entfernt werden. Die Verwendung der Kultur als Routine-Diagnostik ist aber auch nachteilig. Das Sammeln der Kotproben nimmt sehr viel mehr Zeit in Anspruch als beispielsweise das Sammeln von Blut- oder Milchproben. Auch ist die Zeit bis ein Ergebnis vorliegt, sehr lang (bis zu 12 Wochen). In der Praxis bedeutet dies, dass in dieser Zeit das kranke Tier andere Herdenmitglieder infizieren kann. Aus diesem Grund ist die Methode ungeeignet für den ersten Test in Kontroll-Programmen, aber sie ist geeignet, um Ausscheider zu finden oder die Diagnose zu bestätigen.

### PCR

Mittels PCR [MULLIS, 1990] ist es möglich, spezifische Gensequenzen so weit zu vervielfältigen, dass sie nachweisbar werden (z.B. mittels Southern-Blot, Gel-Elektrophorese oder Sonde). Dabei sind verschiedene genetische Elemente zur Identifizierung von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* bekannt. Es eignen sich Insertionselemente und heat shock Proteine, da ihre Sequenz bei anderen Arten nicht vorkommt.

Mit einem 960-bp Fragment des 65-kDa heat shock Protein *hsp65* kann zwischen *M. avium* und *M. paratuberculosis* unterschieden werden. Im *hsp65* Gen der beiden Spezies liegt ein Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) vor, durch den sie eindeutig voneinander unterschieden werden können [ERIKS *et al.* 1996].



Durch einen PCR-Nachweis des *hspX*-Gens (heat shock Protein) konnte *M. paratuberculosis* ebenfalls von anderen Mykobakterien unterschieden werden [MILLER *et al.* 1999 und ELLINGSON *et al.* 2000].

Besonders gut geeignet zur molekularen Identifizierung ist das Insertionselement IS900 (1,451 kb) [GREEN *et al.*, 1989]. Dieses liegt im *M. paratuberculosis* - Genom in vielfacher Kopienzahl (15-20 Kopien) vor, [NASER *et al.* 1998] was zu einer Signalverstärkung führt.

Im humanen Bereich wird IS900 häufig verwendet um *M. paratuberculosis* bei Morbus Crohn Patienten nachzuweisen [SANDERSON *et al.*, 1993; WALL *et al.*, 1993; PAVLÍK *et al.*, 1995; HERMON-TAYLOR *et al.* 1998]. Auch im veterinärmedizinischen Bereich ist IS900 das am häufigsten für die PCR verwendete Element [BAUERFEIND *et al.*, 1996; PILLAI *et al.*, 2002; HALLDÓRSDÓTTIR *et al.*, 2002 GIESE *et al.* 2000; GARRIDO *et al.*, 2000].

#### **1.4.2. Tests zur indirekten Identifizierung**

##### **1.4.2.1. Nachweis von Serum Antikörpern**

Serologische Nachweise sind sehr geeignet, um sich einen ersten Überblick über den Infektionsstatus einer großen Anzahl von Tieren zu informieren. Antikörper werden erst im späteren Verlauf der Krankheit gebildet und es gibt Tiere mit klinischen Symptomen, die keine spezifischen Antikörper bilden [STABEL, 1998].

##### Komplementbindungsreaktion (KBR)

Die KBR war viele Jahre lang der Standardtest für groß angelegte Untersuchungen von Herden und auch der erste serologische Test, der für die Diagnose der Paratuberkulose beschrieben wurde [BANG und ANDERSEN, 1913; TWORT und INGRAM, 1912]. Mangelnde Sensitivität ist der Schwachpunkt der KBR [COCITO *et al.*, 1994], so dass dieses Verfahren nur als Screening-Test angewendet werden sollte [BELLETTI *et al.*, 1992].

Der Test ist international anerkannt und ein negatives Testergebnis ist in vielen Ländern Voraussetzung für den Import von Rindern [COLLINS und SOCKET, 1993]. Der Test ist nicht tierartenspezifisch und trotz seines komplexen Aufbaus nicht standardisiert.

### Agargelimmunodiffusionstest (AGIDT)

Dieses einfache und kostengünstige Verfahren wird hauptsächlich für kleine Wiederkäuer verwendet. Bei einer Spezifität von 100 % ist jedoch die Sensitivität im Vergleich zu anderen Serologischen Verfahren sehr gering (26 %) [SOCKETT *et al.*, 1992b]. Bei einem weiteren Vergleich des AGIDT mit einem ELISA-Verfahren wurde ebenfalls eine geringer Sensitivität ermittelt [CLARKE *et al.* 1996].

### ELISA

Der ELISA gilt heute als serologischer Standardtest zum Nachweis der Paratuberkulose in Blut bzw. Milch. Bei der Erkennung subklinisch erkrankter Tiere weisen viele der Tests allerdings nur eine geringe Sensitivität und Spezifität auf [BECH-NIELSEN *et al.*, 1992; COLLINS *et al.*, 1991]. Die Spezifität konnte durch die Präabsorption der Seren mit einer Suspension aus *M. phlei* gesteigert werden [YOKOMIZO *et al.*, 1988], wogegen andere Autoren zeigten, dass die Präabsorption keine wesentlichen Vorteile bringt [HILBINK *et al.* 1994].

Die beschriebenen ELISA-Methoden unterscheiden sich hinsichtlich der Präparation und der Qualität des Antigens, das zum Beschichten der Mikrotiterplatte benutzt wird. Einige Autoren [COLLINS und SOCKET, 1993; YOKOMIZO *et al.*, 1988] verwendeten Antigene aus dem *M. paratuberculosis* Stamm 18, der sich nach einer molekularbiologischen Identifizierung als *M. avium* Stamm 18 herausstellte [CHIODINI 1993]. Bei einem anderen ELISA-System wurde ein rekombinantes immunogenes 34-kDA-Protein als Antigen verwendet [VANUFFEL *et al.*, 1994], darauf hin gingen die Kreuzreaktionen mit *M. bovis* und dem nahverwandten *M. avium* stark zurück [De KESEL *et al.*, 1993]. Auch ein Zellwandbestandteil, Lipoarabinomannan (LAM), wird als Antigen verwendet [JARK 1996; SUGDEN *et al.*, 1986; SUGDEN *et al.*, 1989; SWEENEY *et al.*, 1994]. Eine vergleichende Studie zeigte für den LAM-ELISA eine signifikant höhere Sensitivität als für einen ELISA, bei dem das Antigen aus *M. avium* Stamm 18 verwendet wurde [REICHEL *et al.*, 1999].

Die drei zurzeit in Deutschland zugelassenen ELISA-Systeme sind der „HerdChek™ *Mycobacterium paratuberculosis*“ (IDEXX, Wörrstadt), der „ELISA zur Serodiagnostik der bovinen Paratuberkulose“ (Riemser Arzneimittel GmbH,

Insel Riems) und der „Svanovir® Paratuberkulose ELISA“ (Svanova, Schweden). Der „Svanovir® Paratuberkulose ELISA“ ist ein auf LAM basierender Test und gilt als sensitivster und spezifischster ELISA [JARK *et al.*, 1997]. Bei den beiden anderen ELISA-Systemen werden die Seren mit *M. phlei* Extrakt vorabsorbiert. Das im „HerdChek™ *Mycobacterium paratuberculosis*“ verwendete Festphasen-antigen stammt aus *M. avium* Stamm 18, er gilt dennoch in den USA als sensiti-ver Test [COLLINS 1996].

#### **1.4.2.2. Detektion der Zell-vermittelten Immunität**

##### Haut Test

Dieses Testverfahren bei Rindern beruht auf einer allergischen Reaktion. Als Allergen dient Geflügeltuberkulin oder besser Paratuberkulin (Johnin) [KÖRMENDY, 1990]. Abhängig von der Applikationsart unterscheidet man zwischen intrakutanem und intravenösem Paratuberkulintest. *M. paratuberculosis* besitzt mehr Antigene als z. B. *M. tuberculosis* oder *M. bovis*. Kreuzreaktionen zu *M. avium* subsp. *avium* sind häufig und weder Geflügeltuberkulin noch Johnin sind hoch spezifisch [GILOT *et al.*, 1993]. Wegen der hohen Zahl falsch positiver oder negativer Ergebnisse, soll der Hauttest in den USA nicht bei Rindern, die für den Export vorgesehen sind, verwendet werden [COLLINS, 1996].

##### Gamma Interferon

Der Nachweis von bovinem Interferon als Produkt der zellvermittelten Immunantwort ist prinzipbedingt in einem frühen Stadium der Infektion zur Diagnostik einsetzbar. Als Untersuchungsmaterial wird heparinisiertes Blut aus peripheren Blutgefäßen benötigt. Dieser Test hat eine höhere Sensitivität als andere Tests für die Detektion der subklinischen Phase der Infektion, es konnte eine Sensitivität über 93 % festgestellt werden [BILLMAN-JACOB *et al.*, 1992]. Trotz dieser hohen Sensitivität zeigt der Test besonders bei jungen Tieren nur eine geringe Spezifität, jedoch sind aber diese die Zielpopulation für den Test. In einer aktuellen Studie wurden alle nicht-infizierten Kontrolltiere wenigstens einmal positiv getestet [McDONALD *et al.*, 1999].

### 1.5. DNA-Nachweis von *Mycobacterium paratuberculosis*

Bevor eine PCR durchgeführt werden kann, muss zunächst die DNA aus den Zellen zugänglich gemacht werden. Dabei erweist sich die besonders dicke Zellwand von *Mycobacterium paratuberculosis* als sehr widerstandsfähig gegenüber gewöhnlichen Aufschlussmethoden. Außerdem sind bei der DNA-Isolation aus Milch Inhibitoren ein großes Problem. Eine besondere Rolle spielt hier der hohe Anteil an unerwünschter Rinder-DNA, die die PCR-Reaktion hemmen kann.

#### 1.5.1. Möglichkeiten zur DNA-Isolation vom Mykobakterien

Die mechanische Lyse von Mykobakterien mit Glas- oder Zirkoniumbeads in einem „Bead beater“ wird von mehreren Autoren beschrieben [ODUMERU *et al.*, 2001; PUYANG *et al.* 1999; COLLINS *et al.* 1993]. Die Bakteriensuspension wird mit den Beads gemischt und in einem „Bead beater“ für einige Minuten bei einer Frequenz von 100 Hz kräftig geschüttelt. Die Zellwände werden so zerstört und die DNA freigesetzt.

Auch dreimaliges, aufeinander folgendes Einfrieren und Aufkochen zerstört die Zellwände, sodass anschließend die DNA extrahiert werden kann [SANGUINETTI *et al.* 1998].

Andere Autoren schließen die Zellwände von Mykobakterien enzymatisch auf. WHIPPLE *et al.* (1987) setzen dazu Lipase, Lysozym sowie SDS und Proteinase K ein. Diese Methode ergibt eine Ausbeute von 250-500 µg/g Zellnassgewicht.

Bei einer anderen enzymatischen Methode werden die Zellwände nach einer Cäsiumchloridbehandlung mit 30 Volumina destilliertem Wasser versetzt, um durch den osmotischen Schock die Zellwände zu sprengen. Danach erfolgt eine Lysozym und Proteinase K Behandlung [BOSE *et al.* 1993].

Bei der Isolation von *M. paratuberculosis* aus künstlich kontaminiertem Gewebe werden die homogenisierten Proben 30 min mit einer *N*-acetyl-L-cystein (mykolytisches Agents)/NaOH/Natriumcitrat-Lösung behandelt. Danach erfolgt eine Inkubation mit Xylol, wobei sich eine cremige Schicht an der Oberfläche bildet. Aus

dieser werden die Mykobakterien nach einer Zentrifugation zurückgewonnen. Die eigentliche Lyse des Pellets erfolgt mit Proteinase K in EDTA und Tween 20 [ENGLUND *et al.*, 1999].

### **1.5.2. PCR-Nachweis von *Mycobacterium paratuberculosis* aus Milch**

Der Nachweis des IS900 von *M. paratuberculosis* aus Milch wurde erstmals 1996 beschrieben [Millar *et al.* 1996]. Die Autoren untersuchten 312 pasteurisierte Milchproben aus verschiedenen Supermärkten und Milchproben von sicher nicht infizierten und infizierten Kühen. Die Nachweisgrenze lag bei 200 - 300 Keimen pro ml Milch. Nach der PCR wurden die Produkte mittels Gel-Elektrophorese aufgetrennt und anschließend mit einer 229 bp-Sonde im Southern-Blot nachgewiesen. Von PCR-Kontaminationen wird berichtet, die durch bestimmte Vorbereitungsvorschriften eliminiert wurden.

Positive PCR-Signale aus allen drei Fraktionen der Milch (Sahne, Molke und Milchpellet) wurden nur bei einer Kuh erhalten, die massiv *M. paratuberculosis* ausschied (Nachweis mittels vorangegangener Kot-Kultur) und bereits klinische Symptome zeigte. Von Rindern, bei denen mittels Kotkultur nur wenige bis keine *M. paratuberculosis* Bakterien nachgewiesen wurden, konnten positive Signale nur in der Sahne und Pellet Fraktion nachgewiesen werden.

*M. paratuberculosis* negative Milch wurde mit freier *M. paratuberculosis* DNA (30 pg/15 ml Milch) oder mit intakten Zellen versetzt (c: 50-2000 Zellen/ml). Bei der mit freier DNA versetzten Milch zeigte sich ein positives Signal entweder nur in der Molke-Fraktion oder in allen drei Fraktionen. Bei Milch, die mit intakten Zellen versetzt wurde, konnte ein Signal nur in der Sahne und Pellet Fraktion nachgewiesen werden.

Da auch bei einer Kuh *M. paratuberculosis* durch IS900 PCR nachgewiesen wurde, deren Kot-Kultur negativ war, gehen die Autoren davon aus, dass Milch eine geeignete Probe ist, um auch latente Infektionen mit *M. paratuberculosis* nachzuweisen [MILLAR, D. *et al.* 1996].

Andere Autoren isolierten aus künstlich kontaminierter, pasteurisierter Milch *M. paratuberculosis* mit verschiedenen Protokollen, die je nach verwendeter Me-

thode Nachweisgrenzen von  $10^5$  KBE/ml bis  $10^2$  KBE/ml hatten [ODUMERU *et al*, 2001]. Die künstlich kontaminierte Milch wurde unmittelbar nach der Kontamination zentrifugiert, die Molke-Schicht entfernt und Sahne und Pellet zur DNA-Isolation vereinigt.

Wenn als einziger Lyse-Schritt das Kochen der Probe für 20 Minuten verwendet wurde, erreichten die Autoren die niedrigste Sensitivität mit  $10^5$  KBE/ml, dabei wurde die DNA mit einem kommerziellen Kit aufgereinigt (QIAamp Tissue Kit/Qiagen oder InstaGene/Bio-Rad). Eine Kombination aus Einfrieren-Auftauen, Lysispuffer und Beat-Beater in Zusammenhang mit der Präzipitation der DNA, also dem Verzicht auf kommerzielle Kits, brachte eine schrittweise Verbesserung der Sensitivität bis zu  $10^2$  KBE/ml.

Durch die Zugabe von 0,0037 % BSA zum PCR-Ansatz konnte die Sensitivität weiter bis zu  $10^{-10^2}$  KBE/ml verbessert werden. Es wird beschrieben, dass Molke im Vergleich zu Sahne und Pellet sehr viele Inhibitoren enthält. Deshalb wird die Molkefraktion verworfen [ODUMERU *et al*, 2001].

Aus künstlich kontaminierter Tankmilch (Frischmilch) konnten PILLAI *et al*. 2002 sowohl durch Milchkultur auf Herrold's Egg Yolk Schrägagar als auch mittels IS900 PCR noch 10-100 KBE/ml nachweisen. Dabei zeigte sich, dass die PCR nur stabil war (24/24 PCR Tests), wenn über 100 KBE/ml vorhanden waren. Bei 10 KBE/ml war das Ergebnis schwankend (12/24 PCR Tests). Aufgereinigt wurden von jeder Probe 50 ml Milch, die mit *M. paratuberculosis* versetzt wurde. Anschließend wurde die Milch zentrifugiert und die DNA aus dem entstandenen Pellet aufgereinigt (InstaGene Kit/Bio-Rad).

Die Variabilität im Nachweis von *M. paratuberculosis* unter einer Konzentration von 10 KBE/ml führen die Autoren auf einen Verlust durch die Zentrifugation und das anschließende Verwerfen der Sahne und Molke zurück. In einer Studie wurden 20 Tankmilchproben von fünf Herden mit Paratuberkulose-Vorbelastung untersucht. Dabei waren 10 der 20 Proben (50 %) in der IS900 PCR positiv, aber nur eine der 20 (5 %) auch in der Milch-Kultur positiv.

Als Grund für die geringe Milchkultur-Sensitivität wird angenommen, dass die meistens verwendeten Protokolle zur Milchkultur eigentlich für die Kotkultur entwickelt wurden und dass die Ausscheidungsrate im Vergleich zum Kot bei der Milch geringer ist. Die Gesamtdauer für die DNA-Aufreinigung und IS900 beträgt bis zum Ergebnis 12-16 Stunden [PILLAI et al. 2002].

### 1.5.3. Problematik des PCR-Nachweises aus Lebensmitteln

Die Entwicklung von schnellen und genauen Systemen zur Detektion und Charakterisierung von Mikroorganismen ist besonders in Bereichen wichtig, in denen die biologische Sicherheit eine große Rolle spielt. Neben medizinischer Mikrobiologie und Hygienekontrolle im Krankenhaus spielt die mikrobiologische Qualitätskontrolle von Lebensmitteln eine immer größere Rolle in der Lebensmittelindustrie. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an Methoden auf DNA-Basis entwickelt, wobei die PCR dabei fast immer zum Einsatz kommt.

Allgemein wird für die meisten PCR-Nachweissysteme aus Lebensmitteln ein Detektionslimit von  $10 \cdot 10^6$  KBE/g erreicht [SCHEU et al., 1998]. Die Sensitivität hängt dabei nicht nur von den Reaktionsbedingungen ab, sondern in einem großen Maß auch von dem Lebensmittel, aus dem die DNA extrahiert wird. Zum Beispiel beträgt die Nachweisgrenze für *L. monocytogenes* aus einer Reinkultur 1 bis 10 Zellen/ml, wenn die DNA jedoch aus Käse isoliert wird, steigt die Nachweisgrenze auf Grund von PCR-inhibierenden Käsebestandteilen auf  $10^6$  Zellen/ml [HERMAN und DE RIDDER, 1993]. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren ist das Hauptproblem bei einem PCR-Nachweis aus Lebensmitteln.

Falsch negative Ergebnisse können verschiedene Ursachen haben:

- die Anwesenheit von Substanzen, die divalente Magnesium-Ionen chelatieren, die so der Taq-Polymerase nicht zur Verfügung stehen.
- die Degradation der Ziel-DNA und/oder der Primer durch Nukleasen
- die direkte Inhibierung der Taq-Polymerase durch verschiedene Substanzen [WIEDBRAUK et al., 1995; KATCHER und SCHWARTZ, 1994; DEMEKE und ADAMS, 1992; AHOKAS und ERKKILA, 1993]

Um falsch negative Ergebnisse auf Grund von Inhibitoren zu entdecken, sind Amplifikationskontrollen notwendig. Meist wird ein exogener DNA-Standard der Probe zugesetzt und simultan zur Probe amplifiziert [ENGLUND *et al.*, 1999; CAVE *et al.*, 1994; JIN *et al.*, 1994; KOLK *et al.*, 1994].

Inhibitoren sind je nach Lebensmittel in sehr unterschiedlicher Art vorhanden. Beispielsweise inhibieren Proben aus Weichkäse in allen Verdünnungsstufen die PCR komplett. Eine vorherige Extraktion mit heißem NaOH/SDS kann diesen Effekt etwas abmildern [ROSSEN *et al.*, 1991]. Inhibitoren in Milch wurden bei der PCR-Diagnose von *L. monocytogenes* beschrieben. Außerdem scheint die PCR gehemmt zu werden, wenn bei der Aufbereitung von Milch PBS zum Waschen der Zellen verwendet wird [COORAY *et al.* 1994]. Bei Bakterien, die in PBS gewaschen wurden, war das Detektionslimit 100 x geringer. Auch wird berichtet, dass in der Milch Proteinasen vorkommen, die die Taq-Polymerase degradieren [POWELL *et al.*, 1994].

Als Hauptinhibitor der PCR stehen aber Calcium-Ionen in Verdacht. 10 % des gesamten Calciums der Milch liegen als freie Calcium-Ionen vor [BRUNNER *et al.*, 1979]. In der Arbeit von BICKLEY *et al.* (1996) wird gezeigt, dass keine Amplifikation über einer Calcium-Konzentration von 3 mmol/l mehr stattfand. Der Grund dafür liegt vermutlich in einer kompetitiven Interaktion zwischen den Calcium-Ionen und den als Cofaktor für die Taq-Polymerase fungierenden Magnesium-Ionen. Durch die Behandlung der Milch-Proben mit EDTA oder Chelex, werden die Calcium-Ionen gebunden, so dass eine Amplifikation in der Anwesenheit von bis zu 6 mmol/l Calcium möglich ist. Der Fettgehalt der Milch, bzw. die vermehrte Anwesenheit von Lipiden hat nach Meinung der Autoren [BICKLEY *et al.* 1996] keine Auswirkungen auf die PCR-Amplifikationsrate, obwohl dies von anderen Autoren beschrieben wird [POWELL *et al.* 1994].

Auch ionische Detergenzien wie SDS, Sarkosyl und Deoxycholat Natriumsalz zeigen inhibitorische Effekte in der PCR [WEYANT *et al.*, 1990]. Unspezifische



DNA (0,4 mg DNA zu einem 100 µl PCR Ansatz) ist ebenfalls in der Lage, die PCR komplett zu inhibieren [ROSSEN *et al.*, 1994].

Bei der Entfernung von Kontaminationen aus der DNA-Lösung stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Eine der einfachsten Methoden um Inhibitoren zu verringern, ist die extensive Verdünnung der Lebensmittelprobe [WANG *et al.*, 1992]. Wenn die Menge an DNA-Template aber stark limitiert ist, kann diese Methode zu einem Verlust an Sensitivität führen.

Die nachzuweisenden Bakterien können auch vor der DNA-Extraktion aus dem Lebensmittel extrahiert werden. Möglich ist hierzu eine Subkultur des Lebensmittels auf Selektivagar, wobei dann nur die Bakterienkolonien zur PCR verwendet werden [GOLSTEYN THOMAS *et al.*, 1991; FURRER *et al.*, 1991]. Zu Problemen kann dies bei bestimmten Nährmedien führen, deren Bestandteile selbst PCR-Inhibitoren enthalten. Der Mykobakterien Selektivnährboden Herrold's egg Yolk Medium (HEYM) enthält Eigelb, welches ein starker PCR Inhibitor ist. Es wurde ein Protokoll zur Entfernung des Eigelbs entwickelt [WHITTINGTON *et al.*, 1998]. Weitere Möglichkeiten sind die differenzielle Zentrifugation und die immunomagnetische Separation (IMS). Dabei wird der Organismus über Antikörper beschichtete Magnetpartikel isoliert [FLUIT *et al.*, 1993; KAPPERUD *et al.*, 1993; OLSVIK *et al.*, 1994; WIDJOJOATMODJO *et al.*, 1991]. Weiterhin können Flüssigkeiten auch durch Ultrazentrifugation oder Dialyse vor der PCR gereinigt werden [KHAN *et al.*, 1991].

Auch eine Aufreinigung der DNA über Membranfilter stellt eine weitere Möglichkeit dar. Bei dieser Technik wird die Adsorption von DNA an eine Matrix aus Glas, Silica oder ein mineralisches Trägermaterial auf Siliziumbasis in Anwesenheit von chaotropen Substanzen wie GTC oder Natriumperchlorat genutzt. Die Bindung erfolgt bei einer hohen Salzkonzentration [ATTAL *et al.*, 1995]. Für die Bindung von DNA an Silicaoberflächen sind hauptsächlich Wasserstoffbrückenbindungen sowie schwache elektrostatische Anziehungskräfte und die Abspal-

tung von Wasser verantwortlich. Dies reduziert die Anzahl freier Wassermoleküle, die die DNA zur Lösung benötigt. Dadurch wird das Reaktionsgleichgewicht zugunsten der neutralen DNA-Silicakomplexe verschoben [MELZAK *et al.*, 1996]. Nach der Bindung werden Proteine und Salzverunreinigungen mit Waschschritten entfernt. Dadurch sollen auch potentielle PCR-Inhibitoren entfernt werden. Anschließend wird die DNA unter Niedrigsalzbedingungen von dem Trägermaterial eluiert.

## **1.6. Grundlagen der Real-Time PCR**

Mittels Real-Time PCR Technik ist es möglich geworden, die eingesetzte DNA-Menge zu quantifizieren. Wird das TaqMan-Prinzip (Sonde) für die PCR gewählt, stellt man damit eine Spezifität des Amplifikates sicher, die sonst nur mit Post-PCR-Techniken, wie Hybridisierung (Southern-Blot) möglich ist.

### **1.6.1. Chemische Grundlagen**

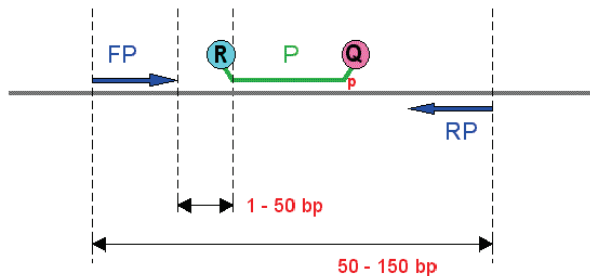
Die Basis für die quantitative Echtzeit-PCR ist die Ausnutzung des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) [CARDULLO *et al.*, 1988]. Ein Fluoreszenz-Farbstoff lässt sich mit dem Licht einer bestimmten Wellenlänge (A1) anregen und strahlt die aufgenommene Energie anschließend in Form von Licht einer anderen Wellenlänge (E1) wieder ab. Anregungs- und Emissionsspektrum des Fluoreszenzfarbstoffes sind dabei für diesen charakteristisch. Wenn ein Fluorochrom (F1) in ausreichender Nähe zu einem zweiten Fluorochrom (F2) gebracht wird, dessen Anregungsspektrum dem Emissionsspektrum des ersten Fluorochrom entspricht, wird die Energie, statt als Licht der Wellenlänge E1 abgestrahlt zu werden, direkt an das Fluorochrom 2 weitergegeben, welches dann Licht der Wellenlänge E2 abstrahlt. Durch die Messung von E1 oder E2 kann man verfolgen, ob die beiden Fluorochrome räumlich beieinander liegen oder getrennt sind. Bei dem hier verwendeten TaqMan-Prinzip [LIVAK *et al.*, 1995] wird das Licht der Wellenlänge E1 gemessen. Das Fluorochrom 1 bezeichnet man als Reporter (*to report*: berichten), Fluorochrom 2 als Quencher (*to quench*: lösen). Reporter und Quencher sitzen auf demselben Oligonukleotid (the *Probe*: Sonde), an 5'- und 3'-Ende.



**Abb. 1-3:** Schematischer Aufbau der Sonde [aus „Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Molecular Probes, eighth Edition“; modifiziert]

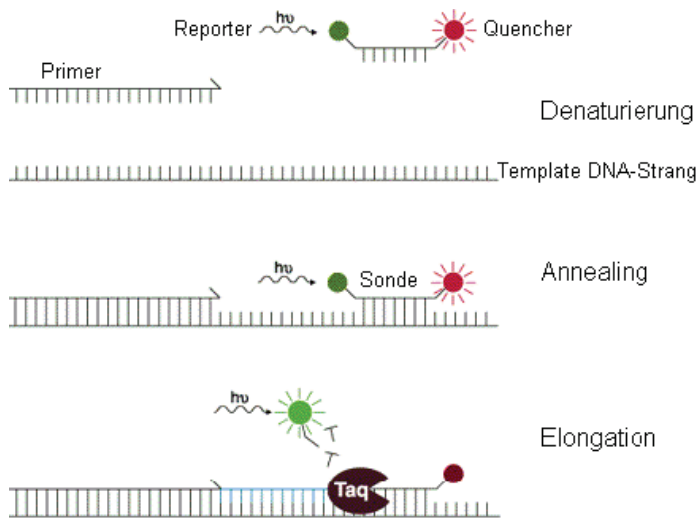
Solange das Oligonukleotid intakt ist, ist die Lichtmenge E1 gering. Die Energie wird an den Quencher weitergegeben und als Licht der Wellenlänge E2 abgegeben. Wird der Reporter vom Quencher gelöst, wird das Licht E1 frei, wobei ein messbares Lichtsignal entsteht, das proportional zur freigesetzten Reporteranzahl ist.

Das Oligonukleotid, das die beiden Fluorochrome trägt (Sonde) wird so gewählt, dass es zwischen den beiden Primern hybridisiert. Standardmäßig wird als 5'-Reporterfarbstoff FAM (6-Carboxy-Fluorescein) eingesetzt, als 3'-Quencherfarbstoff dient TAMRA (6-Carboxytetramethylrhodamin). Die Sonde muss am 3'-Ende chemisch phosphoryliert werden, um eine Extension während der PCR zu verhindern.



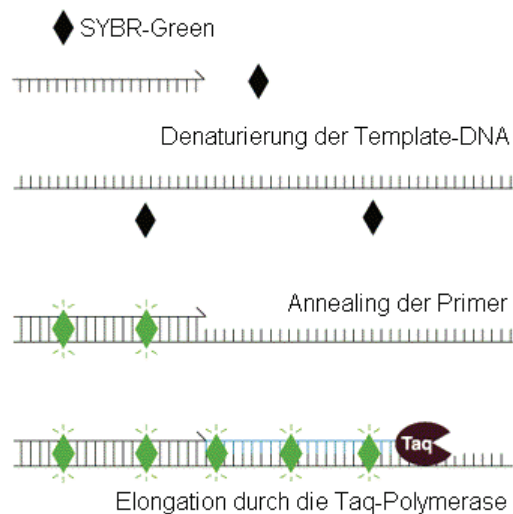
**Abb. 1-4:** Amplikondesign: FP: Forward Primer, RP: Reverse Primer, P: Probe/Sonde, R: Reporter, Q: Quencher [aus: Applied Biosystems, SDS Technology, CD-ROM]

Die Freisetzung des Reporters gelingt unter Ausnutzung der 5'-3'Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase [HOLLAND *et al.*, 1991]. Die Taq-Polymerase verlängert die Primer und hydrolysiert die Sonde bei der Synthese der DNA. Der Reporter wird durch die Abtrennung der Sonde vom DNA-Strang freigesetzt, die Lichtproduktion von E1 steigt an. Bei jedem PCR Zyklus werden mehr Sonden gebunden, durch die Taq-Polymerase Reporter und Quencher voneinander getrennt und mehr Reportermoleküle freigesetzt, entsprechend steigt die Signalstärke, wobei das gebildete Signal strikt sequenzspezifisch ist. Sonden, die nicht gebunden haben, werden auch nicht hydrolysiert und ein Lichtsignal kann von ihnen nicht ausgehen.



**Abb. 1-5:** Schematischer Ablauf eines TaqMan PCR Zyklus [aus „Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Molecular Probes, eighth Edition“; modifiziert]

Bei Verwendung des SYBR-Green Farbstoffes ist diese Spezifität nicht gewährleistet. Der Farbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA und lässt sich zur Fluoreszenz anregen. Über die Erstellung einer Schmelzkurve, die unmittelbar an die PCR anschließt, ist es möglich, die Spezifität der Amplifikate zu überprüfen (Virtuelles Gel). Das Hintergrundsignal liegt bei dieser Variante der Real-Time-PCR höher, da auch Primer-Dimere SYBR-Green binden und es zu einem Signal kommt. In einem Testlauf wird die optimale Primerkonzentration für die jeweilige Reaktion getestet, welche maximale Ausbeute, bei niedrigstem Hintergrund liefert.



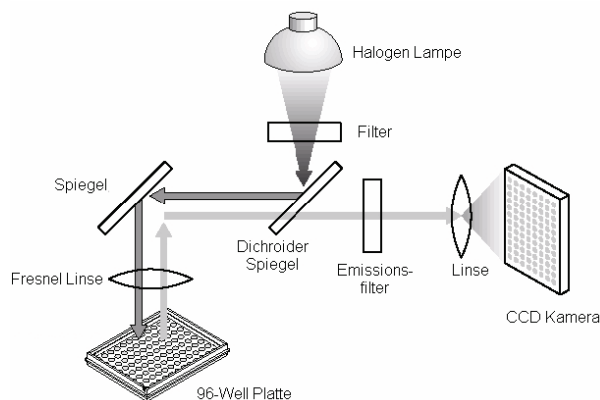
**Abb. 1-6:** Schematischer Ablauf eines SYBR-Green PCR Zyklus [aus „Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, Molecular Probes, eighth Edition“; modifiziert]

### 1.6.2. GeneAmp 5700 Sequence Detection System

Mit dem GeneAmp 5700 Sequence Detection System ist es möglich, die Zunahme an DNA-Produkt in „Echtzeit“ während des PCR Prozesses zu verfolgen. Es regt einen ausgewählten Farbstoff zur Fluoreszenz an und fängt das emittierte Licht ein. Der 5700 Sequence Detektor besitzt ein Halogen Anregungslicht, das durch einen optischen Filter gelenkt, blaues Licht von 485-nm Wellenlänge abgibt – dem optimalen Anregungsspektrum für den Fluoreszenzfarbstoff.

Das blaue Licht wird über ein Spiegel-Linsensystem auf die Probe gelenkt. Der Farbstoff fluoresziert in seiner charakteristischen Wellenlänge wenn er doppelsträngige DNA gebunden hat (520 nm: SYBR-Green). Das emittierte grüne Licht wird zurückgeworfen, passiert das Linsen-Spiegelsystem und wird durch einen optischen Grünfilter auf die CCD-Kamera gelenkt.

Bei jeden Annealingschritt wird ein Bild des emittierten Lichtes von jeder Probe aufgenommen. Dieses ist proportional zur DNA-Menge in jeden Zyklus. Wenn Proben einer bekannten DNA-Konzentration als Standard im selben Lauf wie die unbekannten Proben mitgeführt werden, ist es möglich, die Konzentration der unbekannten Proben zu errechnen.



**Abb. 1-7:** Strahlengang im SDS5700 [aus GeneAmp 5700: User's Manual]

## 2. Methoden

### 2.1. Anlegen und Pflege einer Stammsammlung

#### 2.1.1. Kultivierung von Bakterien

Die verwendeten Bakterienstämme werden auf 7H10 Middlebrook Agar in Röhrchen kultiviert oder in 7H9 Middlebrook Bouillon [Becton Dickinson, Heidelberg] angezogen. Beiden Nährmedien wird das Aminosäuresupplement OADC (100 ml/l) und Mycobactin J (4 ml/l) zugesetzt. Die Inkubation erfolgt bei 37 °C, Suspensionskulturen werden bei 100 rpm geschüttelt. Nach etwa drei Wochen zeigen sich auf 7H10 Middlebrook Agar die ersten Kolonien, eine Suspensionskultur in 7H9 Middlebrook Bouillon hat nach vier Wochen eine Zellzahl von  $1 \times 10^{10}$ /ml (DSM 44133) bis  $2 \times 10^{10}$ /ml (DSM 44135 und „JENA“) erreicht.

#### 2.1.2. Konservierung von *Mycobacterium paratuberculosis*

1 ml Suspensionskultur, bzw. Schrägagarröhrchen, die mit *M. paratuberculosis* Bakterien bebrütet sind, werden mit 1 ml TE-Puffer abgespült, mit 1 ml 7% (v/v) DMSO-Lösung versetzt und bei -30 °C gelagert. Zum Animpfen einer neuen Kultur wird ein Aliquot bei Raumtemperatur aufgetaut und auf 7H10 Agar oder in 7H9 Bouillon ausgebracht.

Eine andere Möglichkeit ist die Überimpfung von 1 ml Suspensionskultur in Mikrobank™-Röhrchen. Hierbei binden die Bakterien an die in den Röhrchen befindlichen Kugeln. Zum Animpfen einer neuen Kultur wird eine Kugel steril entnommen und über den Agar gerollt, bzw. in Bouillon gegeben. Beimpfte Mikrobank™-Röhrchen werden bei -30 °C gelagert.

#### 2.1.3. Ziehl-Neelsen-Färbung

Hierzu wird der TB-color Färbetest verwendet. Es handelt sich hierbei um eine leicht modifizierte Ziehl-Neelsen-Färbung mit dem Unterschied, dass die Karbol-fuchsinlösung auf dem Objektträger nicht erhitzt wird (dabei werden Phenoldämpfe frei), sondern die Hitzefixierung des Präparates vor der Färbung geschieht (Kaltfärbung).

Die Bakterien werden auf einen Objektträger aufgebracht. Entweder wird eine Kolonie vom Festmedium mit einem sterilem Glasstab gepickt und auf den Objektträger gestrichen oder 1 ml Flüssigkultur wird zentrifugiert, das Pellet in 100 µl NaCl resuspendiert und 20 µl davon auf den Objektträger gestrichen.

Die Proben werden an der Luft getrocknet und anschließend hitzefixiert. Dazu wird der Objektträger mit einer Pinzette gefasst und 3 × kurz durch die blaue Bunsenbrennerflamme gezogen. Die Probe wird mit Karbolfuchsinlösung vollständig bedeckt, 5 min gefärbt und mit Leitungswasser abgespült. Danach wird die Probe mit Salzsäurealkohol-Lösung völlig überschichtet und sofort mit Leitungswasser wieder abgespült. Es erfolgt die Gegenfärbung mit Malachitgrünlösung (1 min). Abschließend wird der Objektträger ca. 10 sec mit Leitungswasser abgespült und luftgetrocknet. Nach dem Trocken wird die Probe mit dem Roti-Histokit II eingedeckelt.

Salzsäurealkohol-Lösung (0,75% HCl in Ethanol)

Für 500 ml:	10,1 ml	37 % HCl
	489,9 ml	Ethanol, absolut

## **2.2. Methoden zur Isolierung von Nukleinsäuren**

### **2.2.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Anhand eines UV-Spektrums werden die Konzentration und der Reinheitsgrad von DNA-Proben gemessen. Aus dem Verhältnis der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm ( $OD_{260}/OD_{280}$ ) kann die Reinheit der Proben abgeschätzt werden. Ein Wert von 1,8 und darüber bedeutet, dass die Probe frei von Proteinverunreinigungen ist. Die  $OD_{320}$  sollte bei einer reinen Probe näherungsweise Null betragen. Eine  $OD_{260}$  von 1 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

### **2.2.2. Phenol/Chloroformextraktion und Ethanolfällung von DNA**

Die Nukleinsäure wird durch die Zugabe von 0,1 Vol. 3 M NaAc, pH 4,7 und 2,5 Vol. eiskaltem Ethanol gefällt. Anschließend wird für 30 min bei – 70 °C inkubiert.

Nach Zentrifugation bei  $14000 \times g$  für 30 min bei 4 °C wird das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in Wasser oder 10 mM Tris-HCL, pH 8,5 aufgenommen.

Um Proteine aus wässrigen Lösungen zu entfernen, werden die Lösungen nacheinander mit einem Volumen Phenol, einem Volumen Phenol/Chloroform (25:24) und einem Volumen Chloroform ausgeschüttelt. Dazwischen wird jeweils zentrifugiert ( $14000 \times g$ , 5 min, RT) und die obere, wässrige Phase, unter Ausschluss der Interphase, weiterverarbeitet [SAMBROOK *et al.*, 1989].

### 2.2.3. Analyse von Nukleinsäuren durch Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA-Fragmente werden in 0,8 bis 2,0 %-igen, mit Ethidiumbromidlösung versetzten, horizontalen Agarosegelen mit  $1 \times$  TAE als Laufpuffer aufgetrennt [SAMBROOK *et al.*, 1989]. Vor dem Auftrag wird die zu analysierende DNA mit  $5 \times$  DNA-Laufpuffer versetzt und das Gesamtvolumen auf 10  $\mu$ l eingestellt. Die DNA-Banden werden im UV-Licht sichtbar gemacht. Das zur Fotografie von analytischen Gelen verwendete UV-Licht hat eine Wellenlänge von 254 nm. Aus präparativen Gelen werden die gewünschten Banden unter 366 nm UV-Licht ausgeschnitten. Zur Größenabschätzung werden immer Größenmarker mit aufgetragen.

Ethidiumbromidlösung: 0,5  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid

### 2.2.4. Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen

Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA-Fragmente auf einem präparativen Agarosegel werden die gewünschten Banden unter langwelligem UV-Licht ausgeschnitten und mit Hilfe des *peqGOLD Gelpure Kit* [Peqlab, Erlangen] nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Hierzu wird das ausgeschnittene Gelstück für einige Minuten in Bindepuffer inkubiert. Im Anschluss an das vollständige Auflösen des Gelstücks wird eine Suspension zugegeben, an deren Silicapartikel die DNA binden kann. Nach einer kurzen Inkubation werden die Partikel abzentrifugiert und durch zweimaliges Resuspendieren und Abzentrifugieren gewaschen.



Nach der Trocknung des Silicapellets kann die gereinigte DNA in Wasser eluiert werden.

### 2.2.5. Isolierung von DNA aus Kultur

Eine mit *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* beimpfte 7H9 Middelbrock-Bouillion wird zur Zellernte auf 50 ml Zentrifugenröhrchen verteilt, durch Zentrifugation pelletiert und zweimal in PBS gewaschen. Für jede Isolation wurden Zellzahlen von  $3 \times 10^9$  (DSM 44133) bis  $6 \times 10^9$  (DSM 44135 und „JENA“) verwendet.

#### Nach SANGUINETTI, M. et al. (1998)

Die Bakteriensuspension wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel überführt und bei  $12000 \times g$  für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wird in 100 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Danach wird die Suspension für 5 min bei 100 °C im Wasserbad inkubiert und anschließend 5 min bei -30 °C gelagert. Dies wird dreimal wiederholt.

Chloroform wird in gleichem Volumen hinzugegeben, das Gemisch kurz geschüttelt und dann für 10 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase, die die DNA enthält, wird abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

#### Nach BOSE, M. et al. (1993)

Zu dem Bakterienpellet wird das gleiche Volumen gesättigte Cäsiumchlorid-Lösung, (versetzt mit 1 % Triton-X) gegeben. Nach 10 min gründlichem Mischen wird die Suspension mit dem 30fachen Vol. Wasser aufgefüllt. Nach Zentrifugation bei  $4000 \times g$  für 15 min wird der Überstand verworfen und das Pellet mit Lysozym (Endkonz. 1 mg/ml) eine Stunde auf Eis inkubiert.

Nach Zugabe von SDS (Endkonz. 0,5 %) und Proteinase K (Endkonz. 100 µg/ml) erfolgt eine Inkubation bei 55 °C für 4 h im Wasserbad. Der Zellsuspension wird 1 ml GIT-Cocktail und 1 % (w/v) CTAB zugegeben und bei 65 °C für 30 min inkubiert. Die Zelltrümmer werden bei  $4000 \times g$  für 15 min abzentrifugiert, aus dem

Überstand wird die DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gewonnen (siehe 2.2.2.).

GIT-Cocktail:

4 M	Guanidiumthiocyanat (GTC)
0,053 M	Tris-HCL, pH 7.5
12 mM	EDTA, pH 8.0
0,2 M	NaCl
2,12 % (w/v)	N-Lauroylsarcosin
0,15 M	β-Mercaptoethanol

nach WHIPPLE, D.L. *et al.* (1987)

Dieses enzymatische Lysisverfahren wurde modifiziert und wie im Folgenden beschrieben angewandt. Das gewaschene Zellpellet (s.o.) wird in 500 µl TEN-Puffer resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit Schraubdeckel übertragen. Nach der Zugabe von 8000 U Lipase wird zwei Stunden bei 37 °C auf dem Schüttelinkubator inkubiert. Es folgt eine weitere Inkubation unter denselben Bedingungen nach der Zugabe von 5 mg Lysozym in 50 µl TE-Puffer sowie eine Inkubation von zwei Stunden bei 55 °C nach der Zugabe von 2 mg Proteinase K in 100 µl Wasser und 85 µl einer 20 %-igen SDS-Lösung. Die Enzyme werden anschließend für 20 min bei 75 °C hitzeinaktiviert, es folgt eine Hydrolyse der RNA durch Zugabe von 500 µg RNase A in 50 µl Wasser für 20 min bei 37 °C.

Es wird ein Volumen Phenol-Chloroform zugegeben, kurz geschüttelt und der Ansatz für mind. 30 min bei – 20 °C gelagert. Nach dem Auftauen wird der Ansatz zur Phasentrennung kurz zentrifugiert, die obere wässrige Phase wird abgenommen und in ein 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Phenolphase wird noch mal mit TE-Puffer ausgeschüttelt, wiederum zentrifugiert und der Überstand ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen übertragen.

Die wässrige Phase wird vorsichtig mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol überschichtet, vorsichtig gemischt und über Nacht bei -20 °C gelagert. Am nächsten Tag wird das Gemisch bei  $4000 \times g$ , 4 °C für 40 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das DNA-Pellet luftgetrocknet. Das getrocknete Pellet wird in 200 µl TE-Puffer aufgenommen.

Die Konzentration und Reinheit wird photometrisch durch die Messung der OD bei 260 nm und 280 nm bestimmt (siehe 2.2.1.).

## **2.2.6. Isolierung von DNA aus Milch**

### **2.2.6.1. aus künstlich kontaminierter H-Milch**

#### Chemische Lyse: NaOH und SDS

Zu einem ml Milch werden 300 µl P1 gegeben. Nach der Zugabe von P2 wird zur Lyse der Zellen 5 min bei 80 °C inkubiert. Die Isolation der DNA erfolgt mit dem *E.Z.N.A. Tissue DNA Kit* der Firma Peqlab.

#### Mechanische Lyse: Ribolyser

Ein ml Milch wird in ein 2 ml Zentrifugenröhrchen mit Schraubdeckel überführt, in dem sich drei Glasperlen (Ø 2,85-3,3 mm) befinden. Nach der Zugabe von 300 µl P1 wird der Zellaufschluss im Ribolyser (Speed 4.0 für 30 sec) durchgeführt. Durch anschließende Zentrifugation bei  $4000 \times g$  für 5 min setzt sich eine Sahneschicht ab, die Molke-Fraktion wird überführt, mit 300 µl P2 versetzt und für 5 min bei 80 °C inkubiert. Die Isolation der DNA erfolgt mit dem *E.Z.N.A. Tissue DNA Kit* der Firma Peqlab.

#### Mechanische Lyse: Schütteln mit Glasperlen

Der mechanische Aufschluss im Ribolyser wird durch die Verwendung eines Reagenzglasschüttlers ersetzt. Die Milch wird in ein Zentrifugenröhrchen mit drei Glasperlen überführt und für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit geschüttelt. Die Zugabe der Puffer und die Isolation der DNA erfolgt wie bei der Lyse mit dem Ribolyser.

Isolationspuffer nach SAMBROOK *et al.*, 1989 (zur alkalischen Lyse)

P1	50 mM	Tris-Cl, pH 8.0
	10 mM	EDTA, pH 8.0
	100 µg/ml	RNase A
P2	200 mM	NaOH
	1 % (w/v)	SDS

E.Z.N.A. Tissue DNA Kit II (Peqlab, Erlangen)

200 µl der vorbehandelten Milch (s.o.) werden mit 220 µl BL-Puffer vermischt. Nach einer Inkubation von 30 min bei 70 °C wird die Lösung mit 220 µl 100 % Ethanol versetzt und auf die Mini-Säule aufgetragen. Nach einer Zentrifugation für 1 min bei 10.000 rpm wird das Filtrat verworfen, die Säule zweimal mit 750 µl Waschpuffer gewaschen (12.000 rpm/1 min) und die Säule trocken zentrifugiert, um Waschpufferreste zu entfernen. Anschließend werden 50 µl auf 70 °C erhitzter Elutionspuffer auf die Säule gegeben, für 3 min bei 70 °C inkubiert und die DNA durch eine Zentrifugation bei 14.000 rpm für 1 min wiedergewonnen.

### **2.2.6.2. aus künstlich kontaminierter Rohmilch**

Es wurden verschiedene Aufschlussverfahren getestet. Die DNA-Isolierung erfolgte mit Phenol/Chloroform Extraktion und Ethanolfällung oder verschiedenen Kits zur Aufreinigung von genomischer DNA. Es wurden der *E.Z.N.A. Tissue Kit* der Firma Peqlab (Erlangen), der *Invisorb Cell Spin Mini Kit* der Firma Invitex (Berlin), der *NucleoSpin Food Kit* der Firma Macherey-Nagel (Düren) und der *DNA direct universal Dynal Beads Kit* der Firma Invitrogen (Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers verwendet; bzw. die Testvorschrift an die besonderen Bedingungen angepasst. Wenn eine Abänderung der Vorschrift erfolgte, ist die verwendete Methode aufgeführt. Welche Aufreinigungsmethode jeweils verwendet wurde, ist im Ergebnissteil angegeben.

#### Mechanische Lyse: Ribolyser I

s. 2.2.6.1.: Aufreinigung aus künstlich kontaminierter H-Milch

#### Mechanische Lyse: Schütteln mit Glasperlen

s. 2.2.6.1.: Aufreinigung aus künstlich kontaminierter H-Milch

#### Thermische Lyse in der Mikrowelle

Ein ml Milch wird in ein 2 ml Zentrifugenröhrchen mit Schraubdeckel überführt. Nach der Zugabe von 300 µl P1 wird der Zellaufschluss in der Mikrowelle bei 600 W für 2 min (in Intervallen) durchgeführt. Durch anschließende Zentrifugation bei  $4000 \times g$  für 5 min setzt sich eine Sahneschicht ab, die Molke-Fraktion wird überführt, mit 300 µl P2 versetzt und für 5 min bei 80 °C inkubiert.

#### Wizard Magnetic DNA Purification System for Food (Promega, Mannheim)

Ein ml Milch wird in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 2,5 ml Lysispuffer A und 25 µl RNase A zugegeben. Nach dem Schütteln wird 1,25 ml Lysispuffer B zugegeben und erneut geschüttelt. Danach wird die Lösung 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 6,25 ml Hexan versetzt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 4000 rpm wird die untere Phase ohne Interphase in ein neues Röhrchen überführt. Anschließend wird noch einmal mit 6,25 ml Hexan ausgeschüttelt, zentrifugiert und die untere Phase überführt. Drei ml

Präzipitationslösung werden zugegeben, geschüttelt und mit 6 ml Chloroform versetzt. Nach einer 10-minütigen Zentrifugation bei 4000 rpm wird der Überstand in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und die Lösung mit 100 µl Magnetpartikel versetzt. Die Bindung der DNA an die Magnetpartikelsuspension, Waschen und Eluieren erfolgt nach Angaben des Herstellers.

#### Invisorb Cell Spin Kit (Invitex, Berlin)

Nach einer mechanischen Vorbehandlung durch das Schütteln mit Glasperlen (siehe 2.2.3.1.) wird für 5 min bei  $4000 \times g$  zentrifugiert. Der gesamte Inhalt wird ohne die entstandene Sahneschicht in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl Lysispuffer D 30 min bei 70 °C inkubiert.

Nach der Zugabe von 10 µl RNase A (20 mg/ml) wird 10 min bei RT inkubiert und anschließend die Lösung mit 10 µl Carrier Suspension B und 200 µl Bindepuffer HL vermischt. Nach dem Auftragen auf die Mini-Säule wird für 2 min inkubiert und anschließend 3 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die Mini-Säule wird zweimal mit 550 µl Waschpuffer (1 min/12000 rpm) gewaschen und abschließend für 3 min bei 12000 rpm trocken zentrifugiert. 50 µl Elutionspuffer D werden aufgetragen für 2 min bei 70 °C inkubiert und 2 min bei 10000 rpm eluiert.

#### Invisorb Food Spin Kit (Invitex)

Nach einer mechanischen Vorbehandlung im Ribolyser (Speed 4.0/30 sec) (siehe 2.2.3.1.) wird für 5 min bei  $4000 \times g$  zentrifugiert. Der gesamte Inhalt wird ohne die entstandene Sahneschicht in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 400 µl Lysispuffer G und 40 µl Proteinase K bei 52 °C 30 min inkubiert. Nach der Zugabe von 40 µl RNase A (10 min/RT inkubieren) wird die Lösung 200 µl Bindepuffer T vermischt. Nach dem Auftragen auf die Mini-Säule wird für 1 min inkubiert und anschließend 2 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die Mini-Säule wird zweimal mit 550 µl Waschpuffer (1 min/12000 rpm) gewaschen und abschließend 2 min bei 12000 rpm trocken zentrifugiert. Fünfzig µl Elutionspuffer D werden aufgetragen, 2 min bei 70 °C inkubiert und 2 min bei 10000 rpm eluiert.

### Mechanische Lyse: Ribolyser II

Bei diesem leicht abgewandelten Protokoll zur mechanischen Lyse im Ribolyser wird 1 ml Milch in ein 2 ml Zentrifugenröhrchen mit Schraubdeckel überführt, in dem sich drei Glasperlen befinden. Dann erfolgt der Zellaufschluss im Ribolyser bei Geschwindigkeitsstufe 6.5 für  $3 \times 15$  sec. Die Proben werden anschließend sofort auf Eis gekühlt und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Dann erfolgt die Zugabe von Lysispuffer und Proteinase K nach dem *NucleoSpin® Foodkit* Protokoll [Macherey-Nagel, Düren].

### Fällung der Milchproteine mit Labferment

Zu 1 ml Milch werden 700 µl Labferment Solution gegeben und über Nacht bei 37 °C und 300 rpm inkubiert um die Milchproteine zu fällen. Danach erfolgt eine Zentrifugation von 5 min bei  $4000 \times g$ , wodurch die ausgeflockten Proteine in einem Überstand konzentriert werden. Nur die Molkefraktion wird in ein 2 ml Zentrifugenröhrchen mit drei Glasperlen überführt. Der Zellaufschluss erfolgt mittels Ribolyser (Stufe 6.5) für  $3 \times 15$  sec, wie oben beschrieben.

### Labferment Lösung

10 mM	Labferment 31.000g /mol, Roth
0,02 M	EDTA
2,5 %	Triton X-100

### *NucleoSpin® Foodkit* (Macherey-Nagel, Düren)

Auch dieses Testkit basiert auf einer DNA-bindenden Silica Membran, die sich in einer Mini-Säule befindet. Das Waschen der Säule mit zwei verschiedenen Puffern soll nach Angaben des Herstellers besonders effizient PCR-Inhibitoren entfernen.

Die vorbehandelte Probe (siehe Mechanische Lyse: Ribolyser II und Fällung der Milchproteine mit Labferment) wird 15 sec unter Schwenken mit 500 µl Lysispuffer CF vermischt, nach der Zugabe von 10 µl Proteinase K (20 mg/ml) wird wieder gemischt und anschließend 30 min bei 65 °C inkubiert. Dann erfolgt eine Zentrifugation bei  $12000 \times g$  für 10 min, um Inhibitoren und Zelltrümmer zu pelle-

tieren. 300 µl des Überstands werden in ein neues 1,7 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 300 µl Puffer C4 und 200 µl Ethanol unter Schütteln für 30 sec gemischt. Von diesem Gemisch werden 750 µl auf eine Mini-Säule aufgetragen, für 1 min bei  $10000 \times g$  zentrifugiert und anschließend der Durchlauf verworfen. Es folgen drei verschiedene Waschschrirte mit 400 µl Puffer CQW (1 min/ $10000 \times g$  Zentrifugation), 700 µl Puffer C5 (1 min/ $10000 \times g$  Zentrifugation) und 200 µl Puffer C5 (2 min/ $12000 \times g$  Zentrifugation). Danach wird die Mini-Säule in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben und 50 µl 70 °C warmen Elutionspuffer CE direkt auf die Membran pipettiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei 70 °C erfolgt die Elution der DNA durch Zentrifugation bei  $12000 \times g$  für 1 min. Das Eluat wird bis zur Verwendung in der PCR bei 4 °C gelagert.

#### **2.2.6.3. aus künstlich kontaminiertem Kolostrum**

Es wurde keine Methode speziell für Kolostrum etabliert. Verschiedene Extraktionsmethoden für Rohmilch wurden auch für Kolostrum getestet. Diese sind im Ergebnissteil unter 3.2.2.3. angegeben.

#### **2.2.6.4. mittels immunomagnetischer Separation**

##### Gewinnung von Gesamtprotein aus *Mycobacterium paratuberculosis*

50 ml 7H9 Suspensionskultur ( $1 \times 10^9$  Zellen/ml) wird in ein 50ml Zentrifugenröhrchen, das 5-10 sterile Glasperlen enthält, überführt. Bei Freilandisolaten werden mehrere Kolonien gepickt und in 500 µl 0,9 % NaCl resuspendiert, das sich in einem 2 ml Zentrifugenröhrchen mit 3 Glasperlen befindet. Nach 2 min Schütteln erfolgt für 5 min eine Inkubation bei -30 °C, anschließend wird nochmals 5 min bei 100 °C inkubiert. Nach jeder 100 °C Inkubation wird wieder für 2 min geschüttelt wobei dieser Einfrieren/Kochen/Schütteln-Aufschluss insgesamt 3-mal wiederholt wird. Nach einer dreimaligen Ultraschall-Behandlung für 5 sec bei einer Amplitude von 84 µm<sub>ss</sub> und einer Zentrifugation bei  $10000 \times g$  für 30 min bei 4 °C kann der proteinhaltige Überstand abgenommen werden.



### Dot Blot

2 µl des Zelllysats werden auf die NC-Membran aufgebracht. Nach dem Antrocknen der Proben für 1 h bei 37 °C wird die Membran 1 h/RT oder ÜN/4 °C unter Schwenken mit TBSM geblockt.

Anschließend wird die Membran 3 mal 5 min in TBST unter Schwenken gewaschen und mit dem ersten Antikörper 2 h bei RT unter Schwenken inkubiert. Nach dem Waschen mit TBST (3 × 10 min) erfolgt die Inkubation mit dem zweiten Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schwenken. Die Membran wird dann 5 min in AP-Puffer äquilibriert, es folgt die Entwicklung mit AP-Entwicklerlösung unter ständiger Beobachtung. Die Reaktion wird durch Schwenken der Membran in Wasser gestoppt.

10 × TBS	1,5 M	NaCl
	100 mM	Tris, pH 7,3
TBSM-Blockierungslösung	5 % (w/v)	Magermilchpulver in 1 × TBS
TBST-Waschlösung	0,5 % (v/v)	Tween-Stammlösung (10 % (v/v)) in 1 × TBS
Antikörperinkubationslösung	0,1 % (w/v)	BSA in 1 × TBS
AP-Puffer	100 mM	Tris-HCl, pH 9,5
	100 mM	NaCl
	5 mM	MgCl <sub>2</sub>
AP-Entwicklerlösung	15 ml	AP-Puffer
	50 µl	NBT-Stammlösung
	50 µl	BCIP-Stammlösung
BCIP-Stammlösung	50 mg/ml	BCIP in 100 % Dimethylformamid

NBT-Stammlösung                      50 mg/ml    NBT in 70% Dimethylformamid

### SDS-PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgt mittels 12-15 %igen Polyacrylamidgelen. Es wurde das Mini Gel Mini-Protean II Electrophoresis Cell System von Bio-Rad nach Angaben des Herstellers verwendet.

Die Proben werden 1:1 mit reduzierendem Probenpuffer versetzt, 5 min bei 100 °C denaturiert und dann kurz auf Eis gestellt, anschließend werden 20 µl in jede Geltasche appliziert. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein vorgefärbter Proteinstandard nach Angaben des Herstellers verwendet.

#### Trenngel-Puffer (4 ×, pH 8,8)

1,5 M	Tris-HCl	(Endkonz. im Gel: 0,375 M Tris)
0,4 % (w/v)	SDS	(Endkonz. im Gel: 0,1 %)

#### Sammelgel-Puffer (4 ×, pH 6,3)

0,5 M	Tris-HCl	(Endkonz. im Gel: 0,125 M Tris)
0,4 % (w/v)	SDS	(Endkonz. im Gel: 0,1 %)

#### SDS-Probenpuffer, (2 ×, pH 6,8)

125 mM	Tris-HCl
8 % (w/v)	SDS
20 % (v/v)	Glycerin
10 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
0,02 % (v/v)	Bromphenolblau

#### 10 × SDS-Laufpuffer

250 mM	Tris
1,92 M	Glycin

10 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat in H<sub>2</sub>O

### Western-Blot nach dem Tank-Blot Verfahren

Die mittels SDS-PAGE erstellten Proteinprofile werden nach dem Tank-Blot Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und immunologisch nachgewiesen. Die Blot-Kassette wird nach Angaben des Herstellers im Sandwich-Verfahren zusammengebaut. Der Transfer der Proteine erfolgt bei 350 mA für ca. 70-90 min unter der Verwendung einer Kühleinheit.

#### Transferpuffer für Westernblots

25 mM	Tris, pH 8,3
150 mM	Glycin
10 % (v/v)	Methanol

### Dialyse mit *Spectra Por® Float-A-Lyzer®*

Zuerst wird die zur Aufbewahrung verwendete Natriumazidlösung aus der Membran mittels Pasteurpipette entfernt und die Membran mit entionisiertem Wasser gespült. Anschließend wird der Float-A-Lyzer mit Wasser gefüllt, verschlossen und vorsichtig in ein Becherglas mit Wasser und Rührfisch gesetzt. Es wird für 30 min so gerührt, dass sich unter dem Float-A-Lyzer ein kleiner Strudel bildet. Das Wasser wird dann mittels Pasteurpipette aus der Membran entfernt und diese mit PBS gefüllt. Nach dem Entfernen des PBS kann die Membran mit der zu dialysierenden Probe befüllt werden. Dialysiert wird bei 6 °C gegen PBS (pH 7,2) mit Pufferwechsel nach 2 h, 16 h und 7 h unter Rühren. Anschließend kann die Antikörperkonzentration mit dem Pierce BCA-Kit nach Anleitung des Herstellers bestimmt werden und der Antikörper für die Kopplung eingesetzt werden.

### Kopplung von $\alpha$ -LAM Antikörpern an Dynal-M280 Beads (HOFFMANN, 2002)

270  $\mu$ l der gründlich resuspendierten Dynalbeads werden in die Kopplungsflasche gegeben und dreimal mit 2,5 ml Kopplungspuffer gewaschen. Dazu wird 10 s geschüttelt und die Kopplungsflasche dann 3 min auf einen Magneten gestellt. Durch das Neigen der Flasche um 45 ° werden die Beads in der Flaschen-ecke konzentriert und der Überstand kann abgesaugt werden. Die gewaschenen

Beads werden mit Kopplungspuffer versetzt, das Volumen der Antikörper plus das Volumen des Kopplungspuffers muss hierbei insgesamt 4 ml ergeben.

Dann erfolgt die Zugabe von ca. 80 µg der in PBS umgepufferten Antikörper, der Ansatz wird auf einem Schüttler gemischt und für 24 h bei 37°C auf einem Rollenmischer inkubiert. Die Beads werden wieder wie beim Waschen konzentriert und der Überstand abgesaugt. Es folgt die Zugabe von 2,5 ml Blockpuffer und eine Inkubation von 30 min bei 37 °C. Anschließend werden die Beads wieder wie beim Waschen konzentriert und der Überstand absaugt. Nach der Zugabe von 2,5 ml Blockpuffer erfolgt eine Inkubation von 24 h bei 4 °C auf dem Rollenmixer. Abschließend werden die Beads einmal in 2,5 ml Lagerpuffer gewaschen und dann in 3,2 ml Lagerpuffer resuspendiert.

20 µl dieser Suspension enthalten 50 µg immunomagnetische Beads (IMB), das entspricht  $3,34 \times 10^6$  Beads, die bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert werden.

Kopplungspuffer: PBS pH 7,2

Blockpuffer: 1 % BSA in PBS pH 7,2

Lagerpuffer: 0,1 % BSA  
0,02 % Natriumazid in PBS pH 7,2

Kopplungsflasche: Schraubkappenflasche mit Teflon-Dichtungen, 3,7 ml

#### Immunomagnetische Separation (nach GRANT *et al.*, 1998)

Ein ml Kultur oder Milch wird in ein 3 ml PS-Röhrchen überführt und mit 20 µl IMB versetzt. Während einer Inkubation von 30 min bei RT auf dem Rollenmischer sollen die Antikörper an die *M. paratuberculosis*-Zellen binden. Die Beads werden dann für 10 min auf einem in einem speziellen Magnetständer konzentriert, der Überstand wird verworfen und 500 µl Waschpuffer (PBS pH 7,2) zugeben. Bei Geschwindigkeitsstufe 1,5 wird für 15 sec auf einem Multitube-Reagenzglasschüttler gemischt, wieder für 2 min im Magnetständer konzentriert und

der Waschvorgang zweimal wiederholt. Abschließend werden die Beads in 100 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Vor der Verwendung in der PCR wird bei 100 °C für 15 min lysiert und nur der wässrige Überstand (ohne Beads) in der PCR als Template eingesetzt.

### 2.3. Festlegung der PCR Parameter

Die PCR [MULLIS, 1990] ist eine Methode, um DNA-Fragmente, von denen zumindest ein Teil der Sequenz bekannt ist, zu amplifizieren. Dies wird hier am Insertionselement IS900 durchgeführt.

Ein 25 µl PCR-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

0,5 µl	genomische DNA aus <i>M. paratuberculosis</i>	
0,5 µl	Primer Stina-F	(Endkonz. 5 pmol/µl)
0,5 µl	Primer Stina-R	(Endkonz. 5 pmol/µl)
0,5 µl	dNTP's	(Endkonz. 0,2 mM "each")
2,5 µl	10 × PCR Puffer	(Eppendorf)
2,5 µl	Taq-Master Enhancer	(Eppendorf)
17,9 µl	Wasser <sub>UV</sub>	
0,1 µl	Taq-Polymerase	(5 U/µl; Eppendorf)

**Tab. 1-1: PCR-Programm:**

1 ×	Schritt 1	95 °C	5 min	Denaturierung
40 ×	Schritt 2.1.	94 °C	30 s	Denaturierung
	Schritt 2.2.	58 °C	30 s	Anlagerung der Primer/Annealing
	Schritt 2.3.	72 °C	30 s	Elongation
1 ×	Schritt 3	72 °C	5 min	abschließende Elongationsreaktion

## 2.4. Analyse vorhandener Testverfahren

Es gibt derzeit kein kommerzielles Testverfahren für den Nachweis von *Mycobacterium paratuberculosis* aus Milch mittels PCR. Es wurden in der Literatur beschriebene Methoden getestet, die sich mit der Isolation von anderen Erregern aus Milch befassen.

### Bakterienimmobilisierung mit Zirkoniumhydroxid (nach LUCORE *et al.*, 2000)

Zu 1 ml Milch werden 60 µl 25 % (w/v) Natriumcitrat gegeben und 5 min bei 21 °C und 700 rpm inkubiert. Nach der Zugabe von 240 µl Zirkoniumhydroxid-Lösung werden die Bakterien für 15 min bei 21 °C (700 rpm) immobilisiert. Durch eine 10-minütigen Zentrifugation bei  $500 \times g$  und 7 °C wird das Zirkoniumhydroxid mit den gebundenen Bakterien im Pellet konzentriert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 500 µl Lysispuffer (Cell Spin Kit/Invitek) vorsichtig resuspendiert und für 30 min bei 70 °C (700 rpm) inkubiert.

Nach der Zugabe von 10 µl RNase A (20 mg/ml) setzt sich während einer 10-minütigen Inkubation bei RT das Zirkoniumhydroxid ab, der Überstand wird in ein neues 1,7 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die DNA wird nun aus dem Überstand mit einem Kit (hier: *Invisorb Cell Spin Kit*, Invitek) isoliert oder mittels Phenol/Chloroform Extraktion mit anschließender Ethanolfällung weiter aufgereinigt.

### Herstellung der Zirkoniumhydroxid-Lösung

2 g Zirkonium (IV) Chlorid wird mit 40 ml Wasser versetzt. Die Lösung wird mit 5 M Ammoniumhydroxid auf pH 7 eingestellt. Anschließend wird dreimal mit 200 ml steriler 0,9 % (w/v) NaCl-Lösung gewaschen, um überschüssige Ammoniumionen zu entfernen. Während des Waschprozesses wird das Hydroxid mit der NaCl-Lösung vermischt, innerhalb von 10 min setzt es sich dann zu Boden und es werden ca. 40 % der oberen Phase abgenommen. Das Endvolumen beträgt etwa 200-300 ml. Die Lösung wird in einer dunklen Flasche aufbewahrt und ist bei RT bis zu 6 Monaten stabil.

Enzymatische Degradation von Milchfett (nach RIJPENS *et al.*, 1996)

Zu 1 ml Milch werden 200 µl Lipase-Lysozym Lösung gegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden 700 µl Labferment Lösung zugefügt und abermals 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation ( $14000 \times g/30$  min) wird das Pellet dreimal mit 1 ml H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in 35 µl 150 mM NaOH und 0,5 % (w/v) SDS resuspendiert. In der Mikrowelle werden die Zellen 4 min bei 700 W lysiert. Die DNA wird mit dem *direct universal Dynal Beads Kit* der Firma Invitrogen nach Angaben des Herstellers isoliert.

Lipase-Lysozym Solution	50 U/mg	Lipase
	20.000 U/mg	Lysozym
	in $1 \times$ TE, pH 7.6	
Labferment Solution	10 mM	Labferment 31.000g /mol
	0,02 M	EDTA
	2,5 %	Triton X-100

Chemischer Abbau von Milchfett (nach HERMAN *et al.*, 1995)

Ein ml Milch wird in ein 2 ml Zentrifugenröhrchen mit Schraubdeckel überführt und mit 200 µl 25% Ammoniak, 200 µl 100 % Ethanol, 300 µl Diethylether, 150 µl Petroleumether und 0,07 % (w/v) SDS versetzt. Zwischen jeder Chemikalienzugabe wird geschüttelt. Nach einer Zentrifugation bei  $7500 \times g$  für 15 min wird das Pellet in 150 µl H<sub>2</sub>O gelöst und mit 891 µl 10 M Harnstoff, 150 µl 10 % (w/v) SDS, 18 µl 3 M Natriumacetat, 396 µl 100 % EtOH, 0,5 µl Glycogen, 198 µl Diethylether und 198 µl Petroleumether versetzt.

Zwischen jeder Chemikalienzugabe wird geschüttelt. Nach einer Zentrifugation (15 min/12500 rpm) wird das Pellet mit 1,6 ml 80 % (v/v) EtOH versetzt, erneut zentrifugiert (5 min/12500 rpm) und das Pellet in 50 µl 0,1 M NaOH und 0,4 % (w/v) SDS gelöst. Zur Lyse der Zellen wird die Lösung für 4 min bei 700 W in die Mikrowelle erhitzt. Die DNA-Isolation erfolgte mit dem *E.Z.N.A. Tissue DNA Kit* der Firma Peqlab.

Nach WINTERHOFF, 2000

Ein ml der Milchprobe wird in ein 1,7 ml Schraubdeckel-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer Inkubation von 10 min bei 100 °C (entfällt bei der Verwendung von Kolostrum) wird die Probe auf Eis abgekühlt und mit 100 µl Lysozym (10 mg/ml) 1 h im Eisbad inkubiert. Dann erfolgt die Zugabe von 50 µl Proteinase K (20 mg/ml Stock), 50 µl 20 % (w/v) SDS und 200 µl 500 mM EDTA, dies wird über Nacht bei 55 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei  $5000 \times g$  wird nur die Molkefraktion abgenommen und in den *Invisorb Cell Spin Kit* (Invitek) eingesetzt.



## 2.5. Experimente zur Real-Time-PCR

Zur Klonierung des für die kompetitive PCR und Real-Time PCR notwendigen Plasmidstandards wurde das Klonierungssystem *Positive FORCE Cloning System* (s. 6.2.) der Firma Novagen verwendet. Die Primer für die Amplifikation des 969 bp Inserts aus IS900 sind unter 6.3.5. aufgeführt. Die Vorbehandlung des Inserts, die Ligation und die Transformation in *E. coli* erfolgten nach Angaben des Herstellers. Für die Plasmidpräparation wird der *E.Z.N.A. HP Plasmid Mini-prep Kit I* der Firma Peqlab nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte anhand eines UV-Spektrums (s. 2.2.1)

Für die Quantifizierung ist eine Umrechnung der Plasmidkonzentration auf die Anzahl der *M. paratuberculosis*-Genome notwendig. Dazu erfolgte folgende Berechnung:

1 Basenpaar = 660 g/mol

pIS900 = 6641 bp

Molekulargewicht von pIS900:  $43,8 \times 10^5 \text{ g} = 1 \text{ mol}$

1 Mol =  $6,02 \times 10^{23}$  Moleküle

→  $6,02 \times 10^{23} \text{ Moleküle} = 43,8 \times 10^{11} \mu\text{g}$

→ 
$$\frac{43,8 \times 10^{11} \mu\text{g}}{6,02 \times 10^{23} \text{ Moleküle}} = \frac{43,8}{6,02} \times 10^{-12}$$

→ 1 Molekül pIS900 =  $7,28 \times 10^{-12} \mu\text{g}$

Vorkommen von IS900 im *Mycobacterium paratuberculosis*-Genom:

15-20 × → Durchschnitt: 17,5 ×

→  $17,5 \times (7,28 \times 10^{-12}) \mu\text{g} = 1,27 \times 10^{-10} \mu\text{g}$

→  $1,27 \times 10^{-10} \mu\text{g}$  von pIS900 entspricht einem *M. paratuberculosis*-Genom

Das Plasmid wird dann mit dem Restriktionsenzym *Xba* I linearisiert und mit dem *E.Z.N.A. Gel Extraction Kit* (Pierce, Erlangen) aufgereinigt. Nach der Konzentrationsbestimmung erfolgt die Umrechnung auf *M. paratuberculosis*-Genome, die Herstellung einer 10 log-Verdünnungsreihe des Plasmides und die Aliquotierung. Die Verdünnungsreihe wird bei –30 °C gelagert, jeweils ein Aliquot dient bei der Real-Time-PCR als Standardreihe.

Für die Real-Time-PCR wurde der SYBR Green PCR Master Mix oder der TaqMan Universal PCR Master Mix von Applied Biosystems nach Angaben des Herstellers verwendet. In diesem befindet sich neben Taq-Polymerase, dNTP's (mit dUTP anstatt dTTP) und Puffer auch ein passiver Referenzfarbstoff (ROX) der dazu dient, Ungenauigkeiten beim Pipettieren auszugleichen. Auch er ist durch Kopplung an ein Oligonukleotid gequencht, weshalb ist keine „Online-Messung“ möglich ist. Die ROX-Daten müssen nach dem PCR-Lauf mit dem Reportersignal verrechnet werden [Reporter/Referenz =  $R_n$ -Wert].

Im TaqMan Universal PCR Master Mix befindet sich zudem noch das Enzym *AmpErase* Uracil N-glycosylase (UNG), welches zu Beginn der PCR DNA degradiert, die Uracil anstelle von Thymin enthält. Dadurch soll die Amplifikation von PCR-Produkten und damit falsch positiven Ergebnissen verhindert werden.

Als Primer dienen die unter 6.2. beschriebenen Oligonukleotide IS900-710F und IS900-785R, sowie die TaqMan Sonde IS900-740T. Die Primer – Sonde wurden nach den Standardregeln für Primerdesign von Applied Biosystems mit Hilfe des Computerprogramms PrimerExpress (Applied Biosystems) entworfen.

**Tab. 1-2: Standardregel für Primerdesign bei der Real-Time-PCR**

Parameter	Primer (FP, RP)	Sonde
G/C-Gehalt	30-80 %	30-80%
Tm-Wert	58-60 °C	68-70°C
Wiederholungen gleicher Nukleotide	max. 3 (Keine G's)	max. 3 (keine G's)
Sequenzlänge	min. 18 bp	max. 30 bp
Amplifikatlänge	50-150 bp (besser kürzer)	
3'-Instabilität	max. 2 (G/C's) bei den letzten 5 bp am 3'-Ende	
Autoquenching		kein G am 5'-Ende
G/C-Regel		mehr C's als G's

Der 25 µl PCR-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

0,5 µl	genomische DNA aus <i>M. paratuberculosis</i>		
12,5 µl	2 × SYBR Green Master Mix oder 2 × TaqMan Universal PCR Master Mix		
0,75 µl	Primer 710F	(300 nM)	
0,75 µl	Primer 785R	(300 nM)	
1 µl	Sonde 740T	(200 nM)	nur bei TaqMan
9,5 µl	Wasser <sub>UV</sub> bzw. 9 µl Wasser <sub>UV</sub> bei TaqMan		

**Tab. 1-3: PCR-Programm Real-Time PCR:**

1 ×	Schritt 1	50	2 min	Aktivierung von AmpErase UNG
1 ×	Schritt 2	95 °C	10 min	Denaturierung
40 ×	Schritt 3.1.	95 °C	15 s	Denaturierung
	Schritt 3.2.	60 °C	1 min	Annealing Elongation

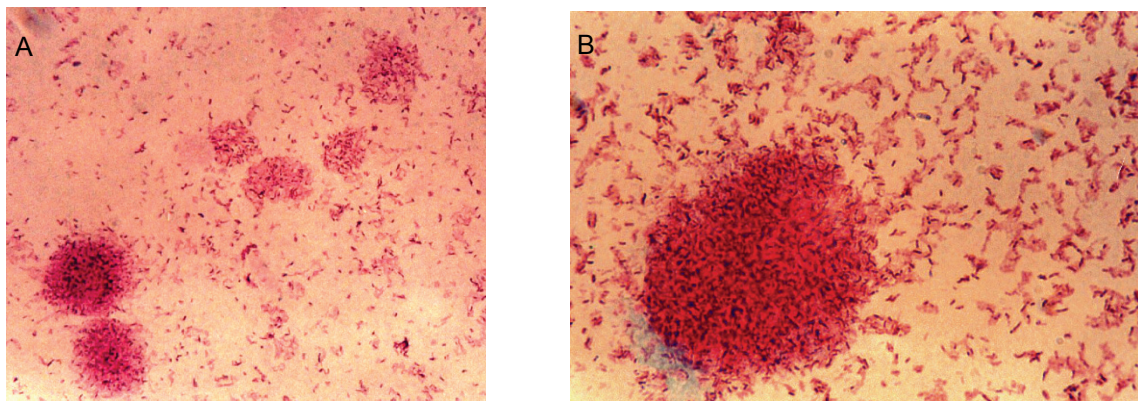
Die Auswertung der Daten erfolgt mit der GeneAmp 5700 Software.

### 3. Ergebnisse

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines molekularen Testkitsystems zum Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* aus Milch. Dieser Test, der auf dem direkten Erregernachweis mittels PCR beruht, soll zur Verbesserung der Paratuberkulose-Diagnostik und zur Qualitätssicherung des Lebensmittels Milch beitragen. Zuerst wurde die Anzucht von *M. paratuberculosis* etabliert, es folgte die Erarbeitung einer DNA-Extraktionsmethode aus der Kultur. Nach der Herstellung von künstlich kontaminierter H-Milch und Rohmilch wurde eine Extraktionsmethode für beide Milchsorten entwickelt. Zum quantitativen Erregernachweis wurde ein Real-Time-PCR Assay aufgebaut. Die gewonnenen Daten wurden mit bereits serologisch untersuchten Viertelgemelksproben verglichen.

#### 3.1. Anlegen und Pflege einer Stammsammlung

Es wurden Bakterienkulturen auf Flüssig- und Festmedium angelegt sowie Dauerkulturen in DMSO-Stocks und Mikrobankröhrchen. Nach einer dreiwöchigen Inkubationszeit von *Mycobacterium paratuberculosis* auf 7H10-Agar waren gut erkennbare Kolonien gewachsen. In 7H9-Bouillion betrug die Zellzahl nach vier Wochen Inkubation  $1 \times 10^{10}$  (DSM 44133) bis  $2 \times 10^{10}$  (DSM 44135) KBE/ml. Durch eine Ziehl-Neelsen-Färbung wurden die Kulturen auf eventuelle Kontaminationen überprüft.



**Abb. 3-1:** Ziehl-Neelsen-Färbung von *M. paratuberculosis* aus 7H9-Flüssigkultur in A: 400 × Vergrößerung und B: in 1000 × Vergrößerung.

Wie in Abbildung 3-1 zu erkennen, lagert sich *M. paratuberculosis* auf Grund seiner Zellwandstruktur in Klumpen zusammen.

Diese Klumpen konnten nicht vollständig entfernt werden, kleinere Anhäufungen blieben auch nach langem Schütteln vorhanden. Dadurch wird zum Beispiel das Auszählen der Bakterien mit der Zählkammer unmöglich. Zudem sind die Zellen ungefärbt nur sehr schwer zu erkennen und eine Färbung auf der Zählkammer ist auf Grund der notwendigen Fixierung nicht möglich.

Deshalb blieb zur Bestimmung der Zellzahl nur der Umweg über die Bestimmung der Kolonie bildenden Einheiten (KBE). Dazu wurde eine 10er log. Verdünnung der Kultur angefertigt und je 100 µl pro Verdünnungsstufe auf Middlebrook 7H10 Festmedium oder Herrold-Egg-Yolk Medium (HEYM) ausgebracht. Nach ca. 8 Wochen wurden die Kolonien ausgezählt und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die KBE/ml Medium bestimmt.

## 3.2. Methoden zur Isolierung von Nukleinsäuren

### 3.2.1. Isolierung von DNA aus Kultur

Genomische DNA aus *M. paratuberculosis* 7H9-Suspensionskulturen wurde nach drei verschiedenen Protokollen isoliert. Die verwendete Zellzahl war bei jedem Protokoll gleich (siehe 2.1.1.).

Die Ertrag und der Reinheitsgrad der präparierten DNA wurden über ein UV-Spektrum ermittelt (siehe 2.2.1.)

**Tab. 3-1:** DNA Konzentrationen und Reinheitsbestimmung

Nach SANGUINETTI, M. *et al.* (1998)

Stamm	Konzentration	E <sub>260/280</sub>	E <sub>320</sub>
DSM 44133	1119,7 µg/ml	1,01	0,401
DSM 44135	637,4 µg/ml	2,05	0,002

Nach BOSE, M. *et al.* (1993)

Stamm	Konzentration	E <sub>260/280</sub>	E <sub>320</sub>
DSM 44133	5,0 µg/ml	Nicht Messbar	0,001
DSM 44135	2,5 µg/ml	Nicht Messbar	0,000

Nach WHIPPLE, D.L. *et al.* (1987)

Stamm	Konzentration	E <sub>260/280</sub>	E <sub>320</sub>
DSM 44133	2021,3 µg/ml	1,02	0,617
DSM 44135	2031,5 µg/ml	1,43	0,042

Es zeigte sich, dass die einfache und schnelle Methode nach SANGUINETTI *et al.* (1998) einen sehr guten Ertrag von akzeptabler Reinheit liefert. Der Ertrag war nach dem Protokoll nach WHIPPLE *et al.* (1987) zwar teilweise zweimal so hoch, doch wies die DNA starke Proteinverunreinigungen auf, die mit einer zweiten Phenol-Chloroform-Extraktion sicher behoben werden könnten. Das Protokoll war allgemein jedoch sehr zeitintensiv und die notwendigen Enzyme teuer.

Der DSM 44133 Stamm wurde aus dem Kot eines mit an Paratuberkulose infizierten Rindes isoliert und ist identisch mit dem ATCC 19698 Stamm. Dieser wird neben klinischen humanen Isolaten in der Literatur am häufigsten verwendet, deshalb wurde bei allen nachfolgenden Experimenten, bzw. künstlichen Kontaminationen nur noch dieser Stamm verwendet.

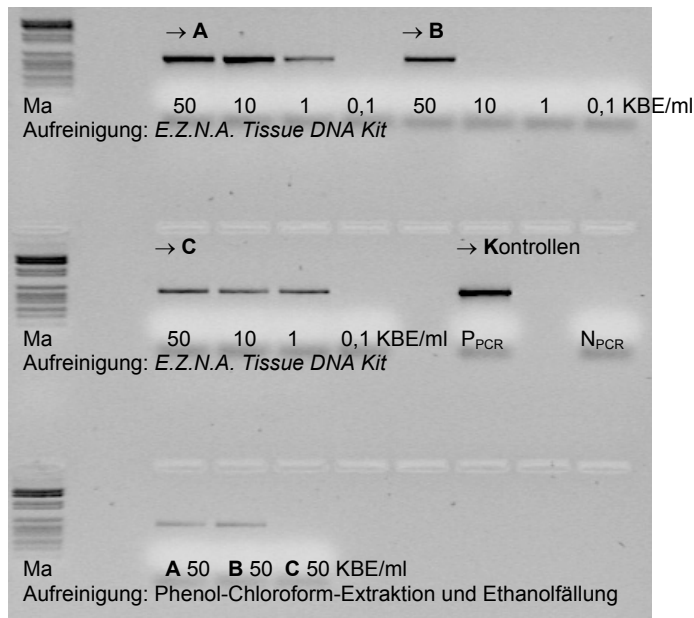
### **3.2.2. Isolierung von DNA aus Milch**

#### **3.2.2.1. DNA-Isolation aus künstlich kontaminierter H-Milch**

Um die Effizienz der Isolationsprotokolle mittels PCR quantitativ überprüfen zu können, wurde H-Milch mit *M. paratuberculosis* versetzt und eine Verdünnungsreihe hergestellt. Dazu wurden *M. paratuberculosis* Zellen aus Kultur abzentrifugiert, zweimal mit 0,9 % (w/v) NaCl gewaschen und mit einem bestimmten Volumen H-Milch, abhängig von der Zellzahl, versetzt. Die Zellzahl wurde über die KBE/ml bestimmt. Die erste kontaminierte H-Milch wurde in 10er log-Schritten in H-Milch verdünnt. Dabei wurde zwischen den Verdünnungsstufen ausgiebig geschüttelt, um ein Absinken oder Verklumpen der Bakterien zu verhindern.

In der Literatur beschriebene Methoden wurden getestet [ROMERO *et al.*, 1999 und MILLAR *et al.*, 1996], zeigen aber nur unbefriedigende Ergebnisse. Die Nachweisgrenze bei der Methode nach ROMERO *et al.*, 1999 lag bei  $1 \times 10^2$  KBE/ml und bei MILLAR *et al.*, 1996 bei  $1 \times 10^4$  KBE/ml H-Milch.

Drei verschiedene Aufreinigungen, die im Rahmen dieses Projektes erarbeitet wurden, erwiesen sich als sehr sensitiv. Es ist damit möglich, bis zu 1 KBE/ml H-Milch nachzuweisen. Die DNA-Aufreinigung über ein kommerzielles Kit ist dabei sensitiver, als die Phenol-Chloroform-Extraktion mit anschließender Ethanol-Fällung.



A: mechanische Lyse: Schütteln mit Glasperlen („Vortexen“)

B: mechanische Lyse: Ribolyser

C: chemische Lyse

**Abb. 3-2:** 1,8 % Agarosegel in TAE. Größe des amplifizierten Fragments: 563 bp mit Stina-Primern (s. 6.3.5.).

Es zeigte sich, dass die mechanische Vorbehandlung eine deutliche Verbesserung gegenüber der alleinigen chemischen Lyse darstellt. Die mechanische Lyse mit dem dafür vorgesehenen Gerät (Ribolyser) bringt dagegen keine Erhöhung der Sensitivität. Die Verwendung eines kommerziellen Kits zur Aufreinigung der DNA führt zu einem besseren Ergebnis in der PCR im Vergleich zur Phenol/Chloroform-Extraktion (s. Abb. 3-2). Dies resultiert vermutlich daher, dass Inhibitoren besser entfernt werden. An die Silicat-Matrix der Mini-Säule bindet hauptsächlich DNA, potenzielle Inhibitoren werden über zwei Waschschriffe von der Säule entfernt. Bei der Phenol-Chloroform-Extraktion können außerdem mögliche Phenolreste die PCR inhibieren.

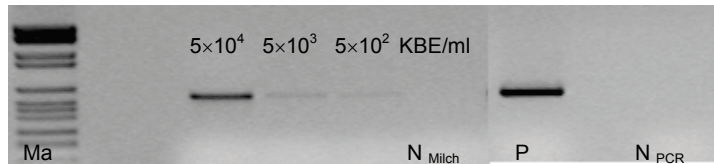
### 3.2.2.2. DNA-Isolation aus künstlich kontaminierter Rohmilch

Rohmilch von Paratuberkulose-unverdächtigen und serologisch-negativen Rindern wurde, wie bei der künstlich kontaminierten H-Milch, mit *M. paratuberculosis* versetzt. Da es auf Grund von Kreuz-Kontaminationen zu Beginn der Experimente, während der Aufreinigung zu falsch-positiven Ergebnissen in der PCR kam, wurde bei jeder Isolation eine nicht kontaminierte Rohmilchprobe ( $N_{\text{Milch}}$ ) mit aufgereinigt, um falsch positive Ergebnisse zu erkennen.

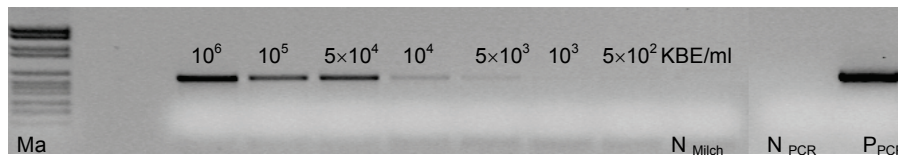


Auf Grund der vorherigen Ergebnisse mit H-Milch wurden die Aufreinigungen, welche bei H-Milch am sensitivsten waren, nun mit Rohmilch getestet.

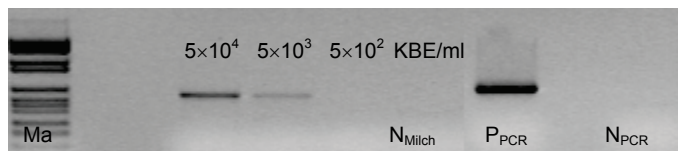
#### Mechanische Lyse: Ribolyser



#### Mechanische Lyse: Schütteln mit Glasperlen



#### Thermische Lyse in der Mikrowelle



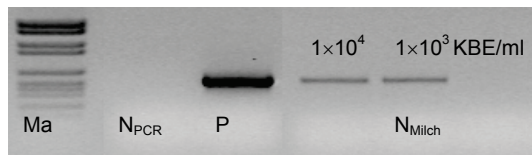
**Abb. 3-3:** 1,8 % Agarosegel in TAE; verschiedene Aufreinigungen. Größe des amplifizierten Fragments: 563 bp mit „Stina-Primern“. P: Positivkontrolle PCR; N PCR und N Milch: Negativkontrollen. DNA Aufreinigung mit *E.Z.N.A. Tissue DNA Kit* (Pqqlab)

Es zeigte sich, dass die bei künstlich kontaminierter H-Milch gut funktionierenden Aufreinigungen nicht dieselben Ergebnisse mit Rohmilch liefern. Die bei H-Milch beschriebene chemische Lyse zeigte bei der Aufreinigung von nativ infizierten Rohmilch kaum positive Ergebnisse (o. Abb.), weshalb sie hier nicht weiter verwendet wurde.

Der sensitivste Nachweis gelingt mit der thermischen Lyse in der Mikrowelle, wo die Nachweisgrenze bei  $5 \times 10^3$  KBE/ml liegt (s. Abb. 3-3).

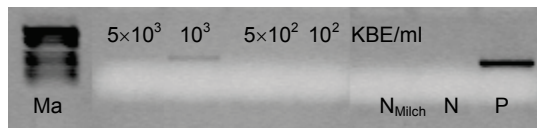
Um standardisierte Bedingungen für die DNA-Aufreinigung zu erhalten, ist die Verwendung von Kits zur DNA-Aufreinigung vorteilhaft. Für die Isolation von DNA aus Milch existiert im Moment noch kein spezieller Kit, deshalb wurden Kits zur Isolation von DNA aus Zellen oder Lebensmitteln auf Ihre Verwendbarkeit für die Isolation von *M. paratuberculosis* aus Rohmilch getestet.

### Invisorb Cell Spin Kit, Invitek



**Abb. 3-4:** 1,8 % Agarosegel in TAE. Größe des amplifizierten Fragments: 563 bp mit „Stina-Primern“. P: Positivkontrolle PCR; N PCR und N Milch: Negativkontrollen

### Wizard Magnetic DNA Purification System for Food, Promega

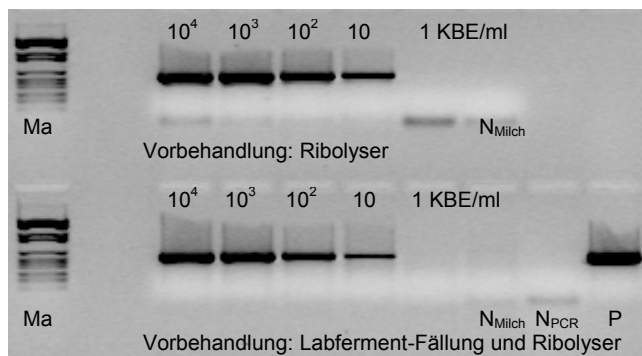


**Abb. 3-5:** 1,8 % Agarosegel in TAE. Größe des amplifizierten Fragments: 563 bp mit „Stina-Primern“. P: Positivkontrolle PCR; N PCR und N Milch: Negativkontrollen

### Invisorb Food Spin Kit, Invitek

Keine positiven Ergebnisse bei  $1 \times 10^4$  und  $1 \times 10^3$  KBE/ml (o. Abb.).

### NucleoSpin Food Kit, Macherey-Nagel

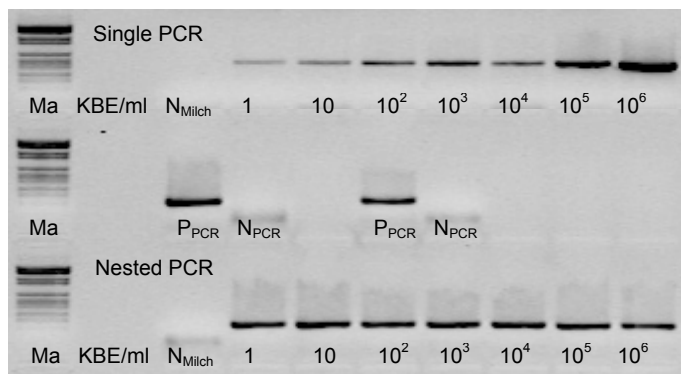


**Abb. 3-6:** 1,8 % Agarosegel in TAE. Größe des amplifizierten Fragments: 563 bp mit „Stina-Primern“. P: Positivkontrolle PCR; N PCR und N Milch: Negativkontrollen

Kommerzielle Kits für die Aufreinigung von z.B. Pflanzen-DNA aus Lebensmitteln oder Cell/Tissue Kits sind nicht ohne Modifikationen für die Isolation von Mykobakterien geeignet. Vorbehandlungen der Milch zum Zellaufschluss sind immer erforderlich. Mechanische Behandlungen wie Schütteln mit Glasperlen oder Aufschluss im Ribolyser sind unerlässlich. Eine mit der Kotkultur vergleichbare Sensitivität wurde mit dem Invisorb Cell Spin Kit (Invitek) mit  $1 \times 10^3$  KBE/ml Milch (s. Abb. 3-4) erzielt. Das beste Ergebnis wurde mit dem NucleoSpin Food Kit

(Macherey-Nagel) erreicht (s. Abb 3-6), hier lag die Nachweisgrenze bei 10 KBE/ml. Die mechanische Lyse der Zellen erfolgte im Ribolyser, wobei das vorherige Ausfällen der Milchproteine keine Verbesserung brachte.

Die Sensitivität kann durch die Anwendung einer nested PCR weiter verbessert werden.



**Abb. 3-7:** 1,8 % Agarosegel in TAE. Oberer Teil: single PCR (563 bp); mittlerer Teil: Positiv und Negativkontrollen für nested PCR; unterer Teil: nested PCR (210 bp). MA: Längenstandard; P<sub>PCR</sub>: Positivkontrolle PCR; N<sub>PCR</sub> und N<sub>Milch</sub>: Negativkontrollen.

In der Abb. 3-7 ist zu erkennen, dass durch die nested PCR im Vergleich zur single PCR deutlichere Signale erhalten werden konnten.

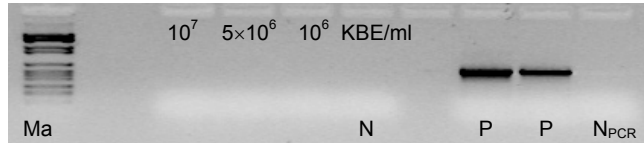
### 3.2.2.3. DNA Isolierung aus künstlich kontaminiertem Kolostrum

Das Kolostrum (Kolostralmilch oder Biestmilch) ist ein unmittelbar nach der Geburt von der Milchdrüse abgegebenes Sekret, welches einen hohen Gehalt an Antikörpern, Vitaminen, Fetten, Mineralien und Wachstumsfaktoren aufweist. Es ist für die gesunde Entwicklung des Kalbes unerlässlich.

Die Beschaffung von Kolostrum stellte sich als schwierig dar. Von serologisch/mikrobiologisch sicher-negativen Rindern konnte kein Kolostrum erhalten werden. Tierärztin Frau Bacher und die AG Rottdorf stellte freundlicherweise eine Probe Kolostrum von einem serologisch positiven Rind zur Verfügung. Da mit dieser Probe zu Beginn der Experimente mit Kolostrum kein positives Ergebnis erzielt werden konnte, wurde analog zur Verdünnungsreihe mit künstlich konta-

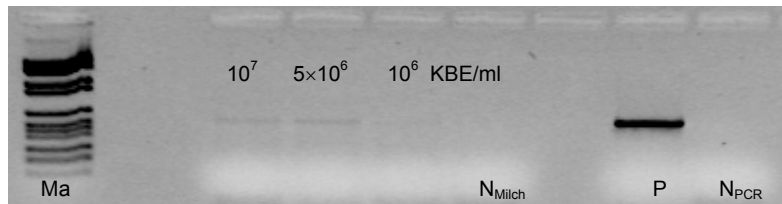
miniierter Rohmilch auch ein Teil dieses Kolostrums mit *M. paratuberculosis* versetzt. Damit wurden verschiedene, bei Rohmilch erprobte Protokolle getestet.

### Mechanische Lyse: Schütteln mit Glasperlen



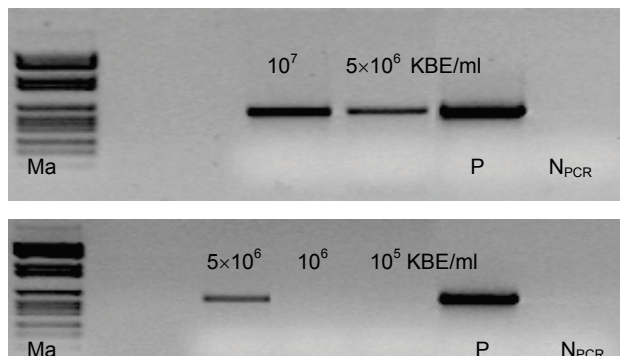
**Abb. 3-8:** 1,8 % Agarosegel in TAE. Größe des amplifizierten Fragments: 563 bp mit „Stina-Primern“. P: Positivkontrolle PCR; N PCR und N Milch: Negativkontrollen. Aufreinigung: *Invisorb Spin Cell Mini Kit* (Peqlab).

### Fällung der Proteine mit Labferment



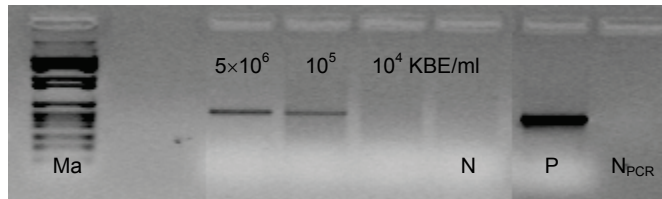
**Abb. 3-9:** 1,8 % Agarosegel in TAE. Größe des amplifizierten Fragments: 563 bp mit „Stina-Primern“. P: Positivkontrolle PCR; N PCR und N (Milch): Negativkontrollen. Aufreinigung: *Invisorb Spin Cell Mini Kit* (Peqlab).

### Bakterienimmobilisierung nach LUCORE *et al.*, 2000



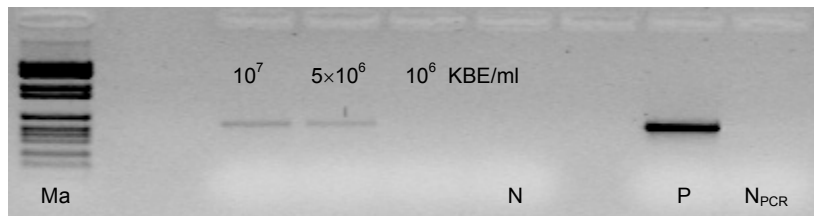
**Abb. 3-10:** 1,8 % Agarosegel in TAE. Größe des amplifizierten Fragments: 563 bp mit „Stina-Primern“. P: Positivkontrolle PCR; N PCR: Negativkontrolle. Aufreinigung: *Invisorb Spin Cell Mini Kit* (Peqlab).

### Enzymatische Degradation von MilCHFett nach RIJPENS *et al.*, 1996



**Abb. 3-11:** 1,8 % Agarosegel in TAE. Größe des amplifizierten Fragments: 563 bp mit „Stina-Primern“. P: Positivkontrolle PCR; N PCR und N (Milch): Negativkontrollen. Aufreinigung: *Invisorb Spin Cell Mini Kit* (Peglab).

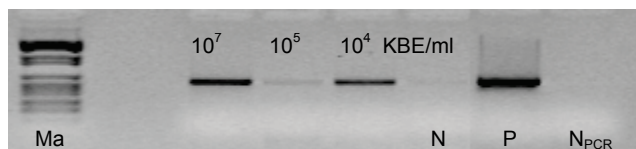
### Chemische Degradation von MilCHFett nach HERMAN *et al.* 1995



**Abb. 3-12:** 1,8 % Agarosegel in TAE. Größe des amplifizierten Fragments: 563 bp mit „Stina-Primern“. P: Positivkontrolle PCR; N PCR und N (Milch): Negativkontrollen. Aufreinigung: *direct universal Dynal Beads Kit* (Dynal)

Nach der mechanischen Lyse gelang kein PCR-Nachweis bei einer Konzentration von bis zu  $10^6$  KBE/ml (Abb. 3-8). Nach der Fällung der Proteine mit Labferment konnte ein sehr schwaches PCR Signal bis  $5 \times 10^6$  KBE/ml erhalten werden (Abb. 3-9). Die Bakterienimmobilisierung zeigte ein deutlich stärkeres Signal bei derselben Verdünnungsstufe von  $5 \times 10^6$  KBE/ml (Abb. 3-10), ein ähnliches Ergebnis konnte nach der enzymatischen und chemischen Degradation von MilCHFett erhalten werden (Abb. 3-11 und Abb. 3-12).

### Isolation nach WINTERHOFF, 2000



**Abb. 3-13:** 1,8 % Agarosegel in TAE. Größe des amplifizierten Fragments: 563 bp mit „Stina-Primern“. P: Positivkontrolle PCR; N PCR und N (Milch): Negativkontrollen. Aufreinigung: *Invisorb Spin Cell Mini Kit* (Peglab).

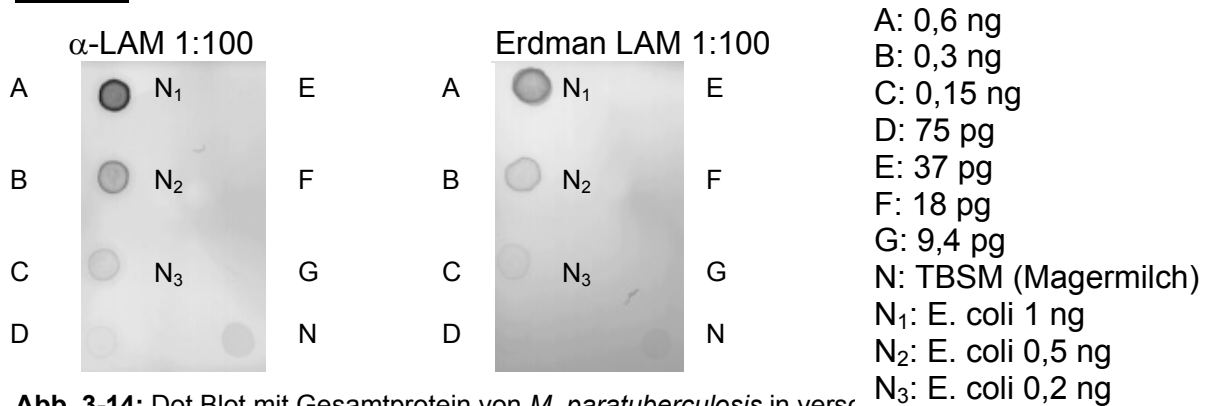
Kolostrum ist im Vergleich zu Rohmilch noch schwieriger zu bearbeiten. Auf Grund des hohen Proteingehaltes ist zur Lyse der Bakterien kein Aufkochen der Probe möglich, da Kolostrum nach der Erhitzung „schnittfest“ war. Kolostrum enthält zudem noch mehr PCR-Inhibitoren als Rohmilch.

Der sensitivste Nachweis von  $1 \times 10^4$  KBE/ml gelang mit der Aufreinigung nach WINTERHOFF, 2000 (Abb. 3-13). Ein positives Ergebnis bei der Negativkontrolle wurde nicht erzielt; obwohl das unkontaminierte Kolostrum, das als Kontrolle verwendet wurde, theoretisch positiv sein könnte. Die erzielten Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass eine speziell auf Kolostrum angepasste Extraktionsmethode entwickelt werden muss. Für Rohmilch funktionierende Protokolle konnten nicht verwendet werden.

#### **3.2.2.4. DNA-Isolation mittels immunomagnetischer Separation**

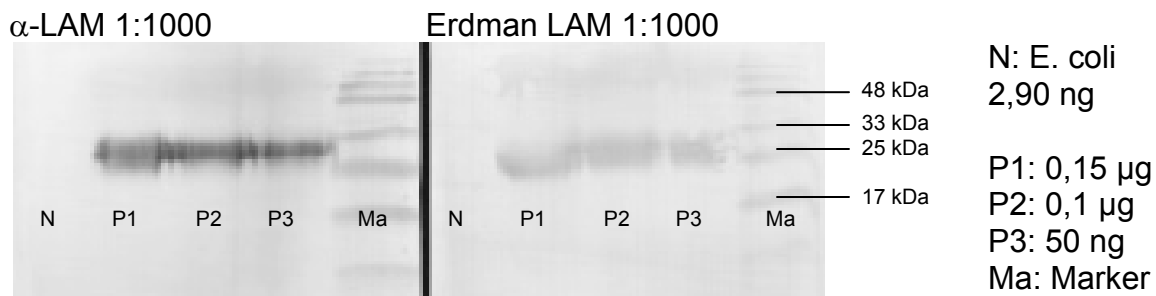
Die Immunomagnetische Separation (IMS) sollte weitestgehend nach GRANT *et al.* 1998 aufgebaut werden. Diese Arbeitsgruppe verwendete einen selbst hergestellten polyklonalen Antikörper. Leider war es uns nicht möglich, diesen Antikörper zu bekommen. Von einer an Tuberkulose arbeitenden Gruppe [J.T. Belisle, NIH, Colorado State University] wurden zwei monoklonale Antikörper gegen den mykobakteriellen Zellwandbestandteil Lipoarabinomannan (LAM, ~30 kDa) zur Verfügung gestellt. Getestet wurde ein Antikörper gegen alle LAM ( $\alpha$ -LAM) und ein Antikörper gegen ein spezielles Tuberkulose-Isolat (Erdman LAM).

Mit einem Gesamtprotein-Aufschluss von *M. paratuberculosis* wurden mittels Dot Blot und Western-Blot die Spezifität und Intensität der Antikörper-Bindungen überprüft.

Dot Blot

**Abb. 3-14:** Dot Blot mit Gesamtprotein von *M. paratuberculosis* in verschiedenen Konzentrationen. Konzentration der Antikörper in 1 : 100 Verd.: 7,5 µg/ml (α-LAM) und 6 µg/ml (Erdman LAM)

Es zeigte sich, dass mit dem α-LAM Antikörper intensivere Signale erhalten werden. Die Negativkontrollen aus einem *E. coli* Gesamtprotein-Aufschluss sind negativ. Auf Grund der hohen Proteinkonzentration in TBSM ist ein Signal in dieser Kontrolle ohne Bedeutung für die Spezifität des Antikörpers.

Western-Blot

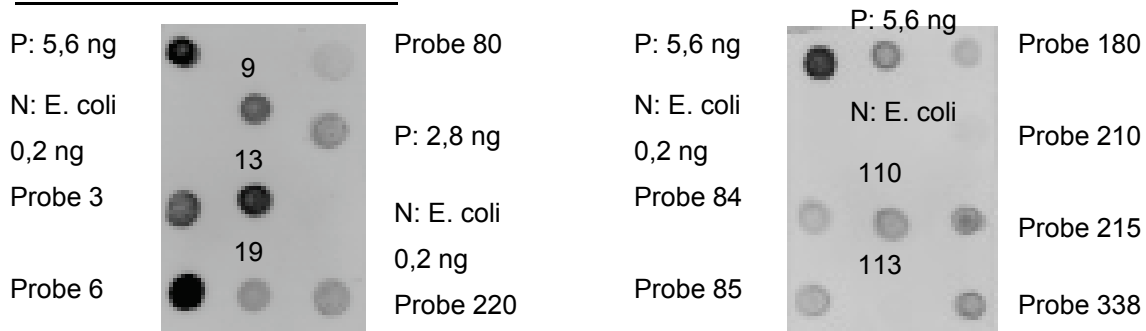
**Abb. 3-15:** Western Blot mit Gesamtprotein von *M. paratuberculosis* in verschiedenen Konzentrationen. Konzentration der Antikörper in 1 : 1000 Verd.: 0,75 µg/ml (α-LAM) und 0,6 µg/ml (Erdman LAM)

Im Western-Blot zeigte sich, dass beide Antikörper LAM erkannten, wobei sich auch hier mit dem α-LAM Antikörper intensivere Banden darstellen ließen. Deshalb wurde für weitere Versuche nur noch dieser Antikörper verwendet.

Weiterhin wurde geprüft, ob der Antikörper nicht nur den Laborstamm, sondern auch Freilandisolate von *M. paratuberculosis* erkennt. Diese wurden im Rahmen

der Routinediagnostik von *M. paratuberculosis* mittels Kultur aus dem Kot verschiedener, serologisch positiver Rindern isoliert. Nach dem Gesamtprotein-Aufschluss wurde auf Grund der begrenzten Menge keine Proteinbestimmung durchgeführt.

### Dot Blot mit Freilandisolate

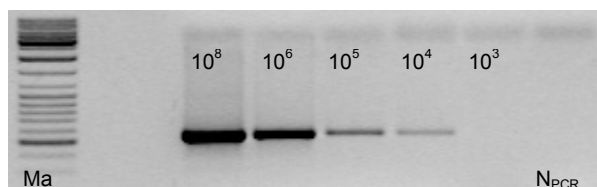


**Abb. 3-16:** Dot Blot mit Freilandisolaten von Untersuchung 02502 PTB lfd. Nr. 3, 6, 9, 13, 19, 80, 84, 85, 101, 113, 180, 210, 215, 220, 338 (Kot-Positive). Antikörperverdünnung 1:100 7,5 µg/ml

Auf Grund der unterschiedlichen Proteinkonzentrationen der Proben kam es zu Schwankungen in der Intensität der Signale. Alle Proben zeigten sich positiv, auch Probe 113 und 210 sind im Original-Blot schwach positiv zu erkennen.

Nach dem Aufreinigen der in Glycerin gelagerten Antikörper mittels Dialyse, wurden diese an die Magnetbeads gekoppelt. Diese immunomagnetischen Beads (IMB) wurden auf ihre prinzipielle Funktionalität mittels einer *M. paratuberculosis*-Kultur in verschiedenen Verdünnungsstufen getestet.

### Immunomagnetische Separation (IMS) aus Kultur



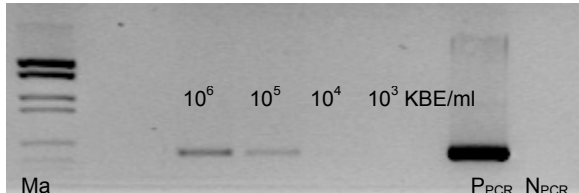
**Abb. 3-17:** 1,8 % Agarosegel in TAE. Größe des amplifizierten Fragments: 563 bp mit „Stina-Primern“. N: Negativkontrolle PCR, Einheit der Zellzahl: KBE/ml

Prinzipiell funktionierte die IMS mit den verwendeten Beads. Die Antikörper sind in der Lage die *M. paratuberculosis* –Zellen zu binden und lassen sich anschlie-



ßend auch über einen Magneten konzentrieren. Die Sensitivität ist allerdings mit nur  $1 \times 10^4$  KBE/ml Kultur nicht befriedigend. Außerdem wurde untersucht, ob die IMS-Methode mit dem Medium Milch funktioniert.

#### Immunomagnetische Separation (IMS) aus H-Milch



**Abb. 3-18:** 1,8 % Agarosegel in TAE. Größe des amplifizierten Fragments: 563 bp mit „Stina-Primern“. P: Positivkontrolle PCR. N: Negativkontrolle PCR.

Auch die IMS mit H-Milch funktioniert im Prinzip. Die Sensitivität sinkt um eine log-Stufe im Vergleich zur Isolation aus Kultur.

Der Versuch der IMS aus Rohmilch barg einige technische Probleme. Nach der Inkubation der IMB mit der Milch, ließen sich diese nur schwer mit einem Magnet zurückgewinnen. In den meisten Ansätzen waren nach der ersten Separation keine IMB mehr vorhanden. Es wird angenommen, dass sich die Beads mit ausgefallener Sahne, die sie wie eine Wolke umschloss, verbanden. Deshalb wurde versucht, die Beads über eine Zentrifugation vor der ersten Separation am Boden des Gefäßes zu konzentrieren um sie dann vor dem Entfernen des Überstandes mit dem Magneten nur festzuhalten. Nach der Zentrifugation bei  $500 \times g$  für 2 min hatte sich aber bereits eine Sahneschicht gebildet, auf deren Oberfläche die Beads saßen.

Auch nach der Entfernung der Sahne durch Zentrifugation ( $14000 \times g/1$  min) wurde kein positives Ergebnis erzielt. Auf Grund dieser Problematik wurde versucht, das MilCHFett mit Trichloressigsäure zu fällen. Dazu wurde zu 1 ml Milch auf Eis 250 µl 12 % (v/v) Trichloressigsäure gegeben und sofort geschüttelt. Nach einer Inkubation von 15 min im Eisbad wurde 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und die klare mittlere Phase abgenommen und diese

für die IMS verwendet. Auch in den verwendeten niedrigen Verdünnungen ( $10^6$  bis  $10^4$  KBE/ml) wurde allerdings kein positives Ergebnis erhalten.

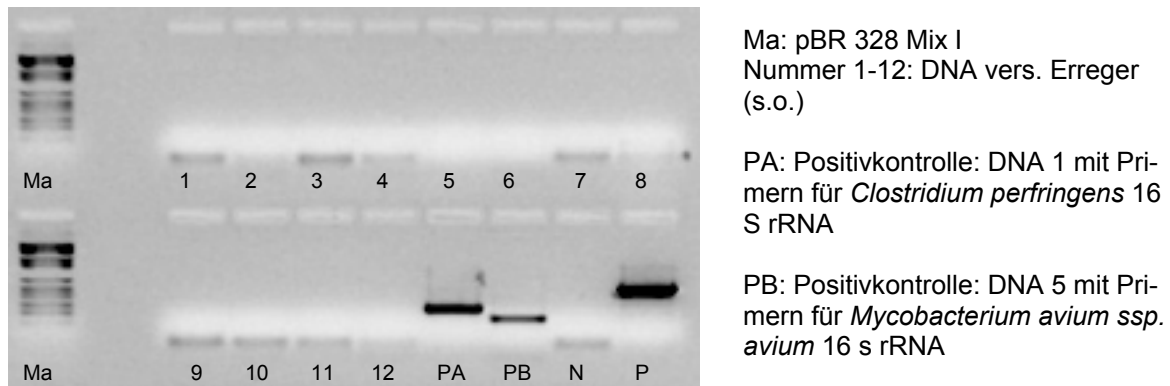
Auf Grund dieser Problematik wurde von einer weiteren Optimierung der IMS als Extraktionsmethode für *M. paratuberculosis* aus Rohmilch abgesehen.

### 3.3. Optimierung der PCR – Ermittlung Spezifität und Sensitivität

Die PCR wurde unter den bei 2.3. aufgeführten Bedingungen durchgeführt und ist stabil und sensitiv. Daher wurden diese Bedingungen nicht weiter optimiert und alle PCR-Reaktionen wurden nach dem angegebenen Protokoll durchgeführt.

Die Spezifitätsprüfung der Primer erfolgte mit der DNA folgender Organismen:

<i>Clostridium perfringens</i>	(1)
<i>Enterobacter cloacae</i>	(2)
<i>Escherichia coli</i>	(3)
<i>Mycobacterium africanum</i>	(4)
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>	(5)
<i>Mycobacterium bovis</i>	(6)
<i>Mycobacterium intracellulare</i>	(7)
<i>Mycobacterium marinum</i>	(8)
<i>Mycobacterium scrofulaceum</i>	(9)
<i>Salmonella saintpaul</i>	(10)
<i>Staphylococcus aureus</i>	(11)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	(12)

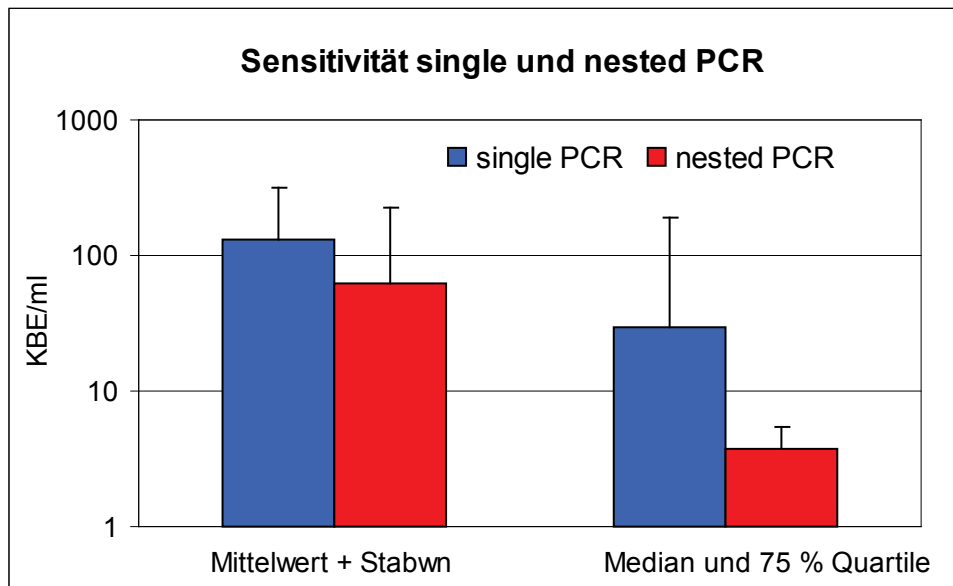


**Abb. 3-19:** Sensitivitätsprüfung der Stina-Primer. 1,8 % Agarosegel in TAE. P: Positivkontrolle PCR. N: Negativkontrolle PCR.

Die verwendeten Primer zeigten auch mit nahen Verwandten von *M. paratuberculosis* keine Kreuzreaktionen. Daraus kann gefolgert werden, dass die Primer für IS900 aus *M. paratuberculosis* spezifisch sind. Die DNA der verschiedenen Erreger wurde freundlicherweise von Dr. H. Hotzel vom Friedrich-Löffler-Institut in Jena zur Verfügung gestellt.

### Bestimmung der analytischen Sensitivität des Verfahrens

Zur Bestimmung der analytischen Sensitivität wurde künstlich mit *M. paratuberculosis* kontaminierte Rohmilch logarithmisch verdünnt. Aus 15 voneinander unabhängigen DNA-Extraktionen nach der in Abb. 3-6 und 3-7 dargestellten Methode (NucleoSpin Food Kit nach Ribolyser Behandlung) wurden die PCR-Ergebnisse von single und nested PCR verglichen.



**Abb. 3-20:** Nachweisgrenze von single und nested PCR in künstlich kontaminierter Rohmilch (n=15 für single PCR; n=10 für nested PCR)

In künstlich kontaminierter Rohmilch lag die ermittelte Nachweisgrenze bei 30 KBE/ml Rohmilch in der einfachen PCR und bei 3,7 KBE/ml Rohmilch in der nested PCR (n=10-15, Median; siehe Abb. 3-20). In der nested PCR konnte *M. paratuberculosis* bis 100 KBE/ml Rohmilch sicher nachgewiesen werden. Bei 80 % der Proben war sogar ein Nachweis bis unter 10 KBE/ml (siehe Abb. 3-7) möglich.

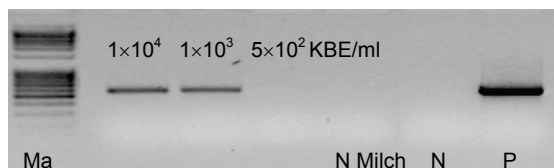
### **3.4. Analyse vorhandener Testverfahren**

Da nach dem derzeitigen Erkenntnisstand kein kommerzielles Testverfahren für den Nachweis von *Mycobacterium paratuberculosis* aus Milch mittels PCR exis-

tiert, wurden verschiedene, in der Literatur beschriebene Methoden getestet, die sich mit der Isolation von anderen Erregern aus Milch befassen.

Das Verfahren nach LUCORE *et al.*, 2000 dessen Prinzip auf der reversiblen Bindung von Bakterien an Metallhydroxiden beruht, wird durch die Möglichkeit der Konzentrierung der Erreger, bzw. aller in der Milch befindlichen Bakterien interessant. Theoretisch sollten die gebundenen Bakterien auch keine Inhibitoren mehr enthalten.

#### Bakterienimmobilisierung nach LUCORE *et al.*, 2000

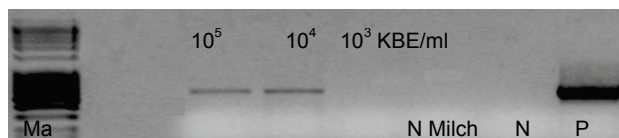


**Abb. 3-21:** 1,8 % Agarosegel in TAE. Größe des amplifizierten Fragments: 563 bp mit „Stina-Primern“. P: Positivkontrolle PCR; N PCR und N Milch: Negativkontrollen. Aufreinigung: *Invisorb Spin Cell Mini Kit* (Peglab).

Dieses Verfahren funktionierte prinzipiell, allerdings liegt die ermittelte analytische Sensitivität mit  $1 \times 10^3$  KBE/ml Milch unter der mit dem neuen Verfahren erreichten Sensitivität (s. Abb. 3-7). Beschrieben ist das Verfahren für den Nachweis von *L. monocytogenes* und *Salmonella enterica* aus gelöster Trockenmilch mit einer Nachweisgrenze von 10-100 KBE/ml.

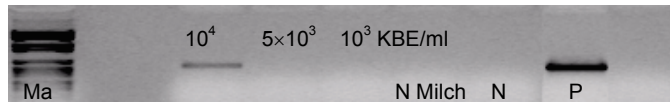
Auch Verfahren, bei denen das Milchfett vor der Aufreinigung mit Hilfe von Enzymen oder Chemikalien entfernt wird, sind vielversprechend. Die beschriebenen Methoden wurden für *Brucella* subsp. (RIJPENS *et al.* 1996) und für *L. monocytogenes* (HERMAN *et al.* 1993) mit Nachweisgrenzen von  $2,8 \times 10^2$  KBE/ml (RIJPENS *et al.* 1996) und 10-5 KBE/ml (HERMAN *et al.* 1993) entwickelt.

#### Enzymatische Degradation von Milchfett nach RIJPENS *et al.*, 1996



**Abb. 3-22:** 1,8 % Agarosegel in TAE. Größe des amplifizierten Fragments: 563 bp mit „Stina-Primern“. P: Positivkontrolle PCR; N PCR und N Milch: Negativkontrollen. Aufreinigung: *direct universal Dynal Beads Kit* (Dynal)

### Chemische Degradation von Milchfett nach HERMAN *et al.* 1995



**Abb. 3-23:** 1,8 % Agarosegel in TAE. Größe des amplifizierten Fragments: 563 bp mit „Stina-Primern“. P: Positivkontrolle PCR; N PCR und N Milch: Negativkontrollen. Aufreinigung: *direct universal Dynal Beads Kit* (Dynal)

Jedoch sind auch diese beiden Verfahren für die Aufreinigung von anderen Erregern aus Milch mit der Nachweisgrenze von  $1 \times 10^4$  KBE/ml nicht sensitiv genug. In der Abb. 3-22 und 3-23 ist jeweils das beste Ergebnis der Versuchsreihe dargestellt. Es wurde auch versucht, die DNA, wie in der Veröffentlichung beschrieben, mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufzureinigen, dies führte aber nur zu einer Verschlechterung der Sensitivität.

### 3.5. Feldstudien

In einem Milchvieh haltenden Agarbetrieb mit Paratuberkulose-Problematik wurden insgesamt 26 Viertelgemelks- und Kotproben genommen und frisch aufgearbeitet. Dabei wurden in der Rohmilch bei 30,7 % der untersuchten Rinder *M. paratuberculosis* mit der entwickelten Methode (Ribolyser mit NucleoSpin Food Kit und Nachweis über nested PCR, s. Abb. 3-6 und 3-7) nachgewiesen.

Die Probennahme konnte direkt im Stall erfolgen. Die Milch wurde nach gründlicher Desinfektion des Euters von Hand gewonnen. Dabei wurde direkt in sterile 50 ml Röhrchen gemolken. Anschließend wurde eine Kotprobe des Tieres direkt aus dem Rektum entnommen.



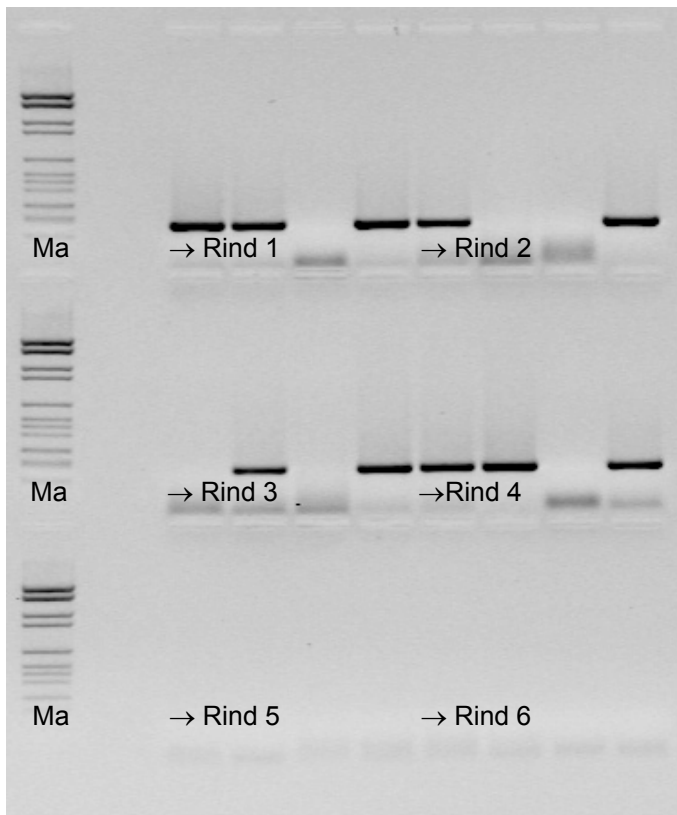
**Abb. 3-24:** Probennahme von Milchproben im Stall. Das erste Bild zeigt ein stark abgemagertes Tier, welches *M. paratuberculosis* auch massiv mit der Milch ausschied.



**Abb. 3-25:** Probennahme von Kotproben.

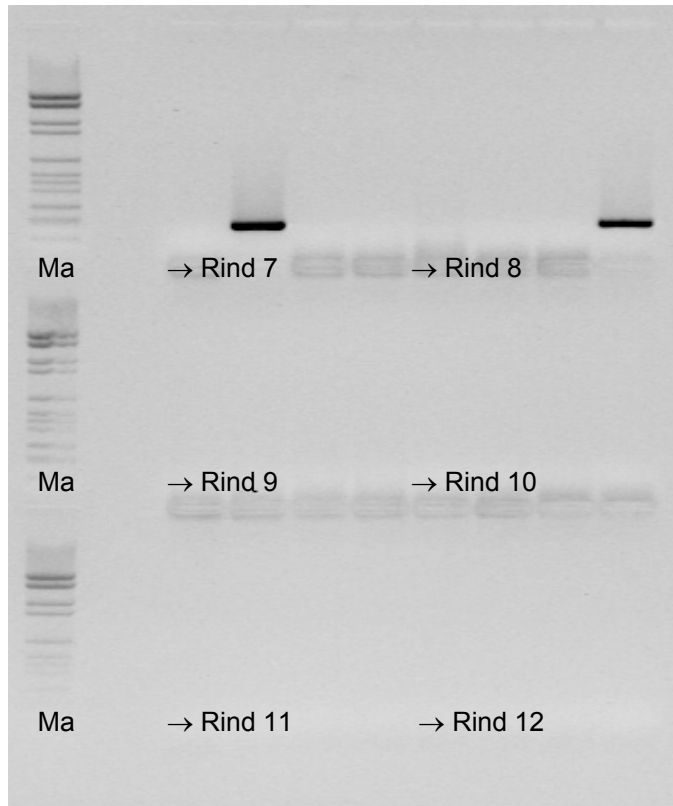
Während der Probennahme zeigte sich, dass die Entnahme von Milchproben (siehe Abb. 3-24) einfacher und schneller auszuführen war als die Entnahme von Kotproben (siehe Abb. 3-25).

Die Milchproben wurden anschließend im Labor nach dem etablierten Nucleo-Spin Food Kit Protokoll nach Ribolyser Behandlung aufgearbeitet. Pro Rind ergaben sich durch die Untersuchung von Viertelgemelksproben vier Einzelproben.

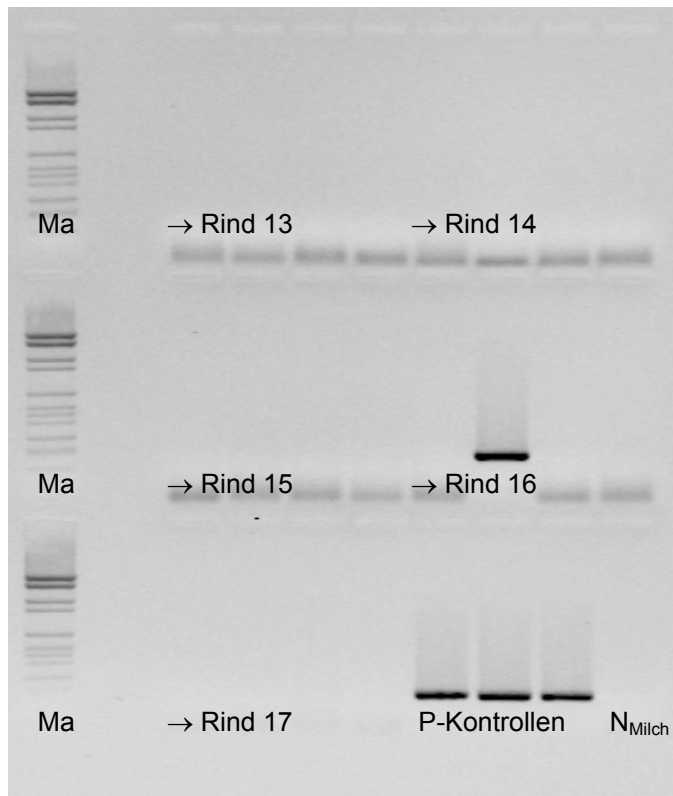


**Abb. 3-26:** 1,8 % Agarosegel in TAE. Größe des amplifizierten IS900-Fragments in der nested PCR: 210 bp. Ma: Längenstandard

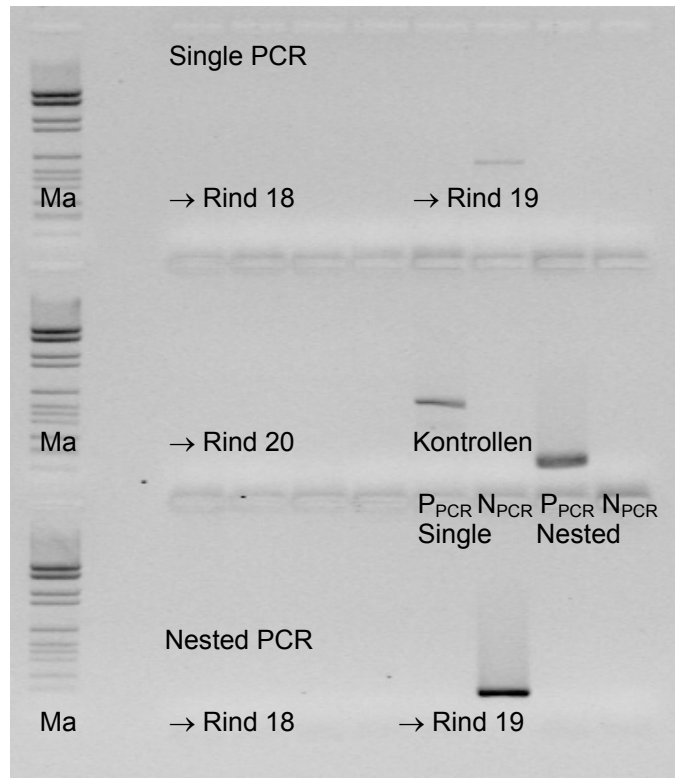




**Abb. 3-27:** 1,8 % Agarosegel in TAE. Größe des amplifizierten IS900-Fragments in der nested PCR: 210 bp. Ma: Längenstandard



**Abb. 3-28:** 1,8 % Agarosegel in TAE. Größe des amplifizierten IS900-Fragments in der nested PCR: 210 bp. MA: Längenstandard. P-Kontrollen: Aufreinigungskontrollen Milch  $10^3$ ,  $10^2$  und  $10$  KBE/ml,  $N_{Milch}$ : Negativkontrolle für die Aufreinigung.



**Abb. 3-29:** 1,8 % Agarosegel in TAE. Größe des amplifizierten IS900-Fragments in der nested PCR: 210 bp. MA: Längenstandard.

Der obere Teil des Geles zeigt die single PCR, der untere Teil die nested PCR derselben PCR. Von Rind 20 wurde hier die single PCR aufgetragen.

In Abbildung 3-26 bis 29 sind die Ergebnisse der Untersuchung der Viertelgemelksproben nach dem erarbeiteten Protokoll dargestellt.

Die Kontrollen von nested und single PCR, sowie negative Rinder sind nicht gezeigt. Die Rinder 20-26 sind in jeder PCR negativ getestet worden.

Alle untersuchten Rinder wurden bereits mindestens einmal serologisch und mikrobiologisch positiv auf *M. paratuberculosis* getestet. Das nicht alle Rinder in der Rohmilch-PCR positiv sind, ist mit der intermittierenden Ausscheidung des Erregers zu erklären. Dies zeigt auch die Notwendigkeit, die Untersuchung in sinnvollen Zeitabständen zu wiederholen, um alle Milchausscheider eines Betriebes zu finden.

Bei den molekularbiologischen Untersuchungen der Milch zeigten sich 8 von 26 Rindern (30,7 %) in mindestens einer Viertelgemelksprobe positiv auf *M. paratuberculosis*.

Es zeigte sich, dass der Erreger nicht aus allen Eutervierteln zeitgleich ausgeschieden wurde. Um eventuelle Verdünnungseffekte zu vermeiden, sollten daher Viertelgemelksproben untersucht werden, da so einzelne Ausscheider innerhalb der Herde identifiziert werden können. Bei der Untersuchung von Pool-Proben, z. B. aus der Milchleistungsprüfung, können dagegen nur hochgradig Erreger ausscheidende Tiere erkannt werden. Die Untersuchung von Tankmilch kann zur Identifizierung von Problembetrieben dienen, interessant ist dies z. B. für Molke-reibetriebe unter dem Gesichtspunkt der Lebensmittelsicherheit.

### **3.6. Experimente zur Real-Time-PCR**

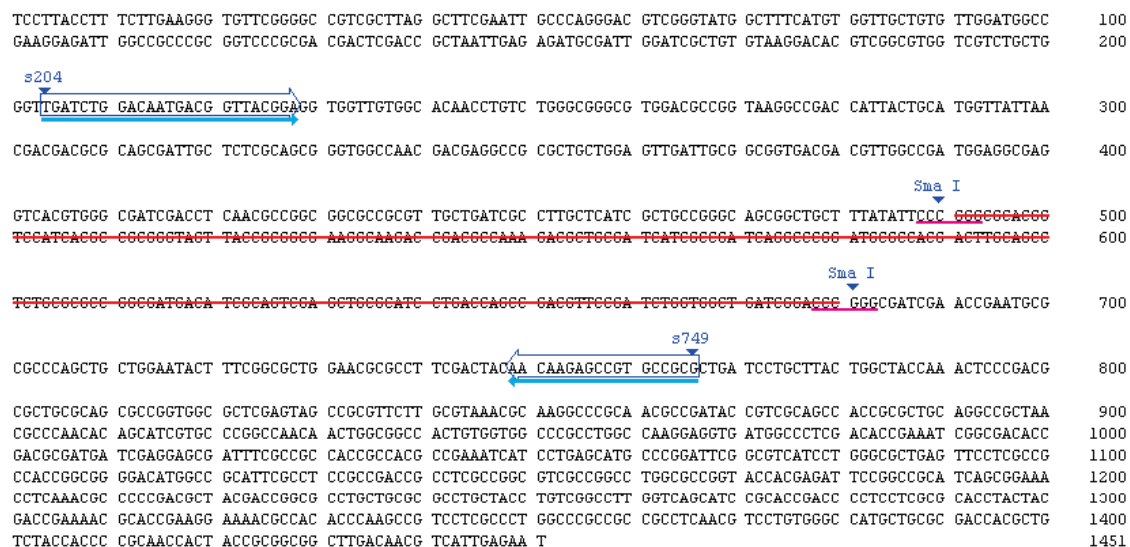
Für die Quantifizierung mittels Real-Time PCR ist ein DNA-Standard notwendig. Die Quantifizierung des Standards muss sehr genau sein, da von ihm die Qualität der Bestimmung der unbekannten Proben abhängt. Die Quantifizierung von genomischer DNA ist auf Grund ihrer Sekundärstrukturen oft ungenau, auch ist sie weniger stabil (Scherkräfte) und ihre Aufreinigung komplizierter. Für die Gewinnung von genomischer DNA aus *M. paratuberculosis* ist zudem eine bis zu acht Wochen dauernde Kultur notwendig. Aus diesen Gründen verwendet man als Standard ein Plasmid, das die Zielsequenz enthält. Die Aufreinigung und Quantifizierung von Plasmiden ist einfach, da als Wirt *E. coli* dient, der sich innerhalb von 16 h in der stationären Phase befindet.

Um eine Quantifizierung auch unabhängig von der Real-Time-PCR durchführen zu können, ist die Entwicklung einer kompetitiven PCR geplant worden. Dabei wird ein interner Standard konstruiert, der in einer definierten Menge der PCR beigefügt wird. Der interne Standard wird mit denselben Primern unter denselben Bedingungen mit amplifiziert wie die unbekannte Probe. Er unterscheidet sich vom Zielamplifikat geringfügig in der Länge, ist also in der Gelelektrophorese eindeutig vom Testtemplate zu unterscheiden. Man führt mehrere Reaktionen durch, bei denen jeweils gleiche Menge Proben-DNA, aber unterschiedliche Mengen an Standard-DNA eingesetzt werden. Nach der PCR werden die Mengen an Standard- und Probentemplate mittels Elektrophorese miteinander vergli-

chen. Dort wo sie gleich intensiv sind, war die Menge an Proben- und Standard-template gleich.

Für die Klonierung wurden Primer ausgewählt, mit denen möglichst das gesamte Insertionselement amplifiziert wird. In diesem 969 bp Fragment müssen die Primer/Sonde für die Real-Time-PCR liegen und die Stina-Primer binden.

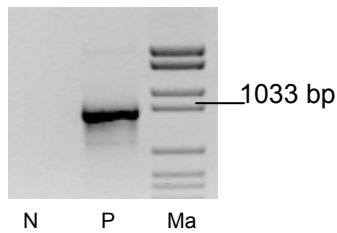
In dem 563 bp Stina-Fragment musste ein Bereich außerhalb der Primerbindungsstellen gefunden werden, in dem ein Restriktionsenzym zweimal schneidet, was sonst aber im Fragment und im Vektor nicht vorkommt. Über diese Schnittstelle soll das Stina-Fragment verkürzt werden. Das Restriktionsenzym *Sma* I (Erkennungssequenz: 5'-CCC↓GGG-3') erfüllt diese Bedingungen.



**Abb. 3-30:** Klonierungsrelevanter Sequenzausschnitt von IS900 für die Herstellung eines Standards für eine kompetitive PCR. s204: forward-Primer, s749: reverse-Primer für Stina-Fragment. Die rot durchgestrichene Sequenz markiert den Abschnitt der durch den *Sma* I-Verdau wegfällt.

Nach der Klonierung des gesamten 969 bp Fragments entstanden durch eine *Sma* I-Restriktion zwei Fragmente von 6451 bp und 189 bp Länge. Nach Gelelu-tion des 6451 bp-Fragmentes, Aufreinigung und anschließender Religation ent-steht ein Vektor, auf dem die Stina-Primer binden, aber ein Amplifikat von nur 374 bp Länge entsteht.

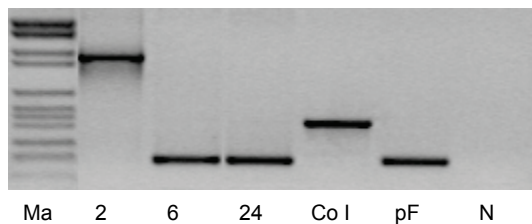
### Amplifikation von IS900



**Abb. 3-31:** 1,8 % Agarosegel in TAE. P: 969 bp Fragment für die Klonierung des Real-Time-PCR Standards. N: Negativkontrolle.

Das Fragment wurde aus dem Gel eluiert und mit dem *Positive FORCE Cloning System* der Firma Novagen in den Vektor pFORCE I kloniert. Die Überprüfung der Klonierung erfolgte durch eine Kolonie-PCR mit den entstandenen Klonen.

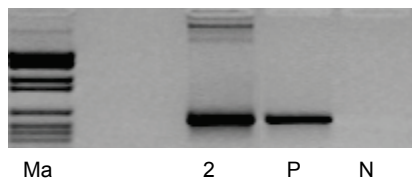
### Kolonie-PCR mit pFORCE-Primern zur Überprüfung der Klonierung



**Abb. 3-32:** 1,8 % Agarosegel in TAE. PCR mit lysierten Kolonien. 2, 6, 24: Klone; Co I: Kontrollinsert zur Überprüfung der Klonierung; pF: pFORCE-Vektor ohne Insert; N: Negativkontrolle PCR

Der Klon Nr. 2 trägt das Insert IS900 und hat damit eine Länge von 1209 bp, die Klone 6 und 24 tragen kein Insert und haben so die selbe Länge wie pFORCE mit 237 bp; das Kontrollinsert (Co I) zur Überprüfung der Ligations- und Transformationseffizienz hat die korrekte Länge von 449 bp.

### PCR zur Insertüberprüfung

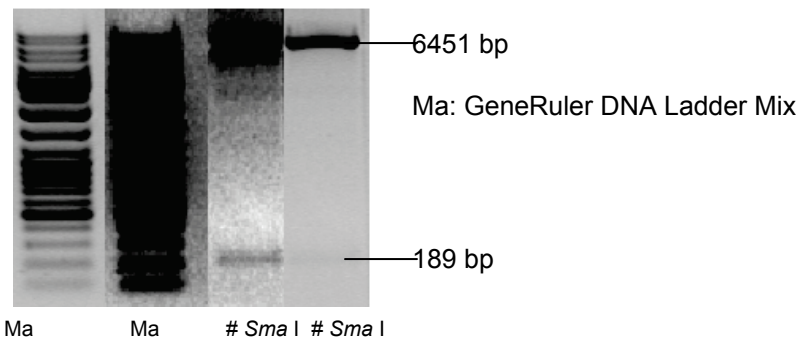


Ma: pBR328 Mix I

**Abb. 3-33:** 1,8 % Agarosegel in TAE. PCR zur Insertüberprüfung. Größe des amplifizierten Fragments: 563 bp mit „Stina-Primern“. P: Positivkontrolle PCR; N: Negativkontrolle PCR

Zur Überprüfung des Inserts wurde der Klon 2 als Template in der PCR eingesetzt. Es konnte das 563 bp Fragment amplifiziert werden. Das bedeutet, dass die Klonierung des Real-Time-PCR Standards erfolgreich war. Der Klon mit dem Insert IS900 erhält den Namen pIS900. Er wurde verwendet, um den Standard für die kompetitive PCR zu erstellen. Nach der *Sma* I-Restriktion von pIS900 wurde ein 189 bp Fragment aus dem Stina-Amplifikat freigesetzt.

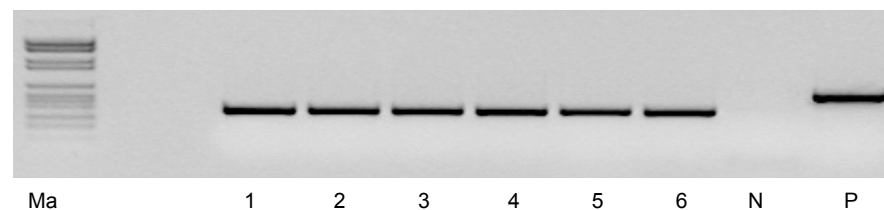
#### *Sma* I-Verdauung von pIS900



**Abb. 3-34:** 0,8 % Agarosegel in TAE. Um das 189 bp Fragment sehen zu können musste das Foto stark überbelichtet werden. Zur Veranschaulichung der Größen ist das normalbelichtete Foto beigelegt.

Das 6451 bp Fragment wurde aus dem Gel eluiert, aufgereinigt und religiert. Die nach der Transformation erhaltenen Klone wurden mittels Kolonie-PCR getestet.

#### Kolonie-PCR mit Stina-Primern zur Überprüfung der Klonierung



**Abb. 3-35:** 1,8 % Agarosegel in TAE. 1-6: Klone; P: Positivkontrolle PCR; N: Negativkontrolle PCR

Die Amplifikate der Klone 1-6 haben die Länge von 374 bp. Die Klonierung des Standards für die Kompetitive PCR war erfolgreich. Das um 189 bp kürzere pIS900 Plasmid erhielt den Namen pIS900 w/o 189 bp.

Um von der optischen Dichte einer Plasmidlösung auf die Anzahl von Kopien zurückzuschließen, wird das Gewicht eines Plasmides in  $\mu\text{g}$  berechnet (s. 2.6).

1 Molekül pIS900 =  $7,28 \times 10^{-12} \mu\text{g}$

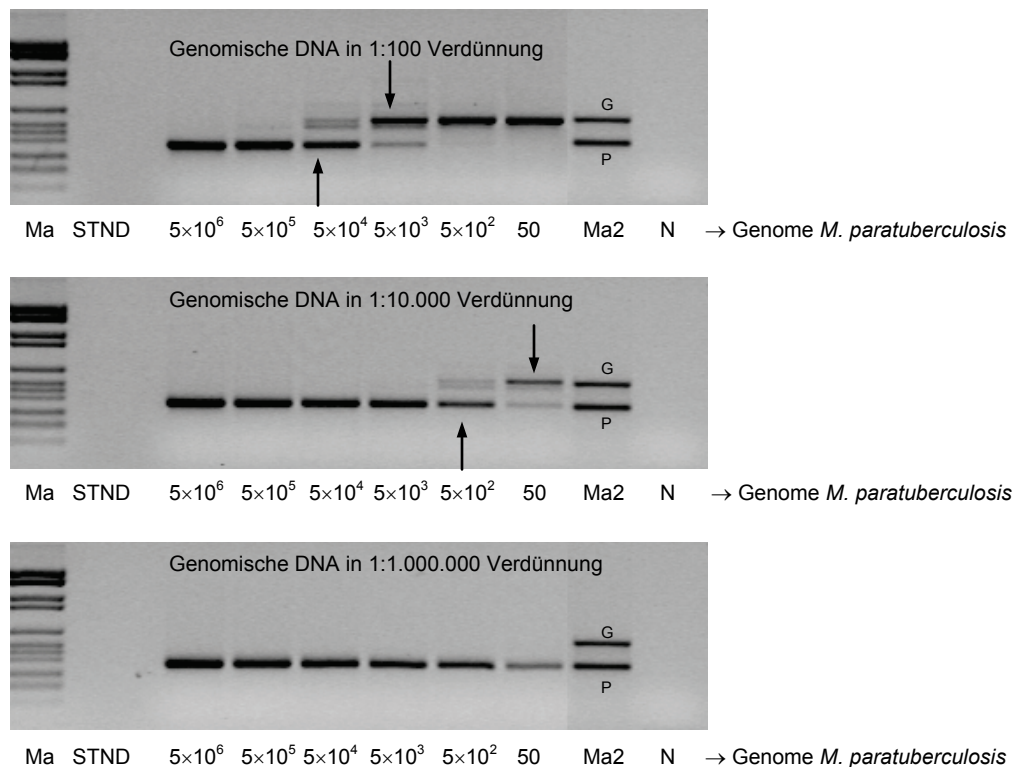
1 Molekül pIS900 w/o 189 bp =  $7,07 \times 10^{-12} \mu\text{g}$

Diese Zahl wird  $\times 17,5$  genommen, da IS900 im *Mycobacterium paratuberculosis* Genom 15-20-mal vorkommt (Mittelwert). Ein *M. paratuberculosis* Genom entspricht also 17,5 Plasmiden.

$1,27 \times 10^{-10} \mu\text{g}$  pIS900 entspricht 1 *M. paratuberculosis*-Genom

$1,24 \times 10^{-10} \mu\text{g}$  pIS900 w/o 189 bp entspricht 1 *M. paratuberculosis*-Genom

#### Kompetitive PCR mit pIS900 w/o 189 bp als interner Standard



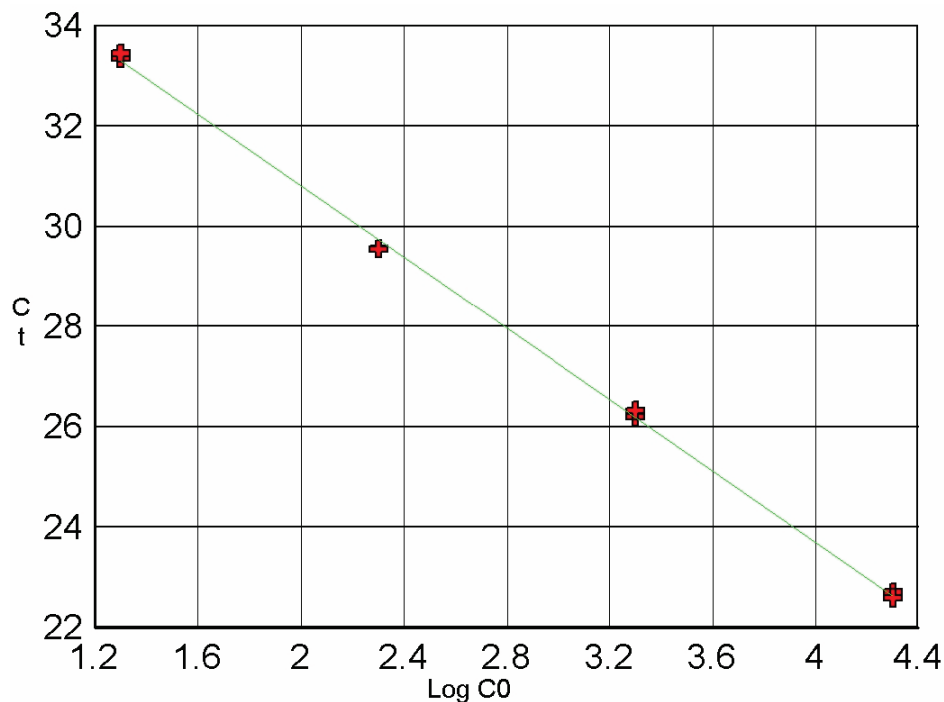
**Abb. 3-36:** 1,8 % Agarosegel in TAE. Zur Verdeutlichung wurde ein zweiter Marker nachträglich eingefügt. G: Genomische DNA, P: Plasmid DNA

Durch Vergleich der Bandenintensität von Standard (STND) und Testtemplate kann man auf die Anfangskonzentration an DNA zurückschließen. In einer 1:100

Verdünnung der genomischen DNA zeigte sich eine ähnliche Intensität bei der  $5 \times 10^4$  *M. paratuberculosis* Genome entsprechenden Standardbande. Der 1:10.000 Verdünnung der genomischen DNA entspricht die  $5 \times 10^2$  Genome Standardbande. Das bedeutet, dass sich in der unverdünnten genomischen DNA-Lösung zu Beginn der PCR-Reaktion  $5 \times 10^6$  Genome/0,5µl befanden ( $1 \times 10^7$  Genome/µl).

#### Real-Time PCR mit Standard pIS900 mit SYBR-Green Chemie

Um die Qualität des Standards zu beurteilen und einen ersten Eindruck von der Quantifizierung mittels SYBR-Green zu bekommen, wurde ein Lauf mit dem Standard pIS900 durchgeführt. Verschiedene Aufreinigungen aus Milch wurden dabei als unbekannte Proben mitgeführt.



**Abb. 3-37:** Standardkurve mit pIS900. Die vom GeneAmp SDS5700 erstellte Standardkurve über  $C_t$ -Wert und  $\log_0$  der Startkopienzahl.

**$C_t$ -Wert:** Der sogenannte Threshold Cycle drückt die Zyklenzahl aus, bei der zum ersten Mal ein Anstieg der Reporter-Fluoreszenz über den Schwellenwert erfasst wird. Für die Quantifizierung ist eine Standardkurve notwendig. Damit errechnet

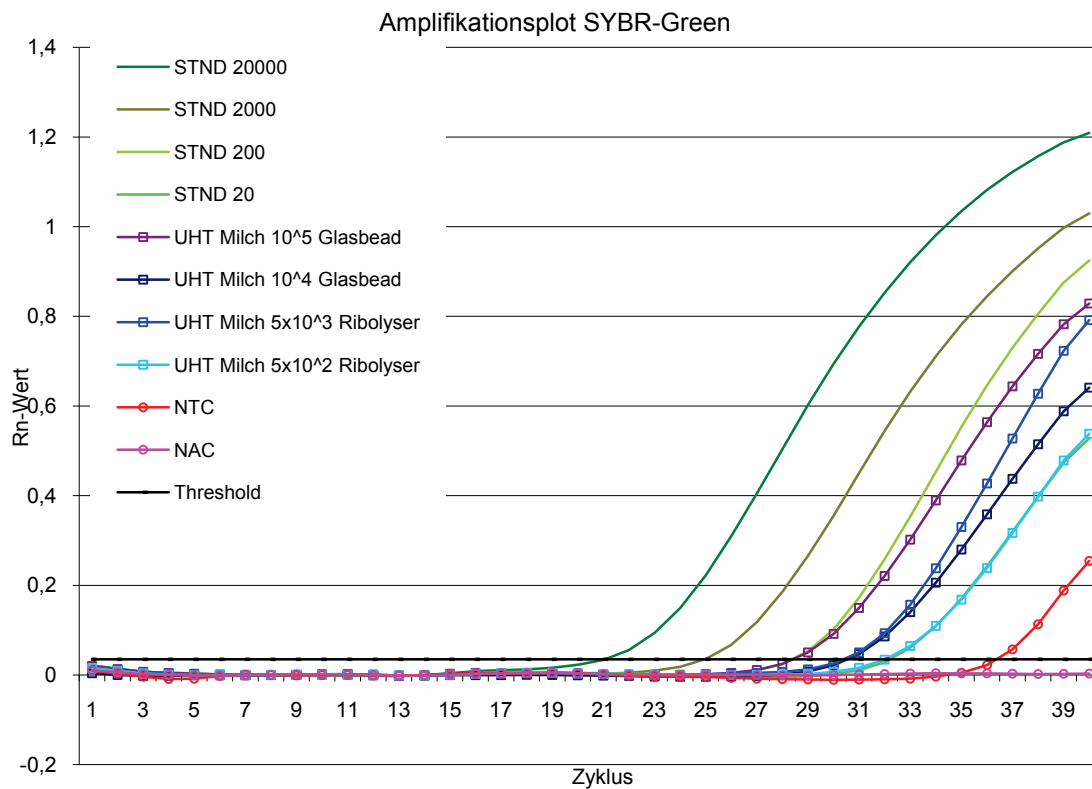


das System über Interpolation die Startkopienzahl der zu untersuchenden Proben.

**Tab. 3-2:** Ct-Werte des Standards (Mittelwerte)

Name	Ct-Wert	Genome
STND	20,92	20000
STND	24,94	2000
STND	28,36	200
STND	32,2	20

Der  $R_n$ -Wert (normalisiertes Reportersignal) entspricht dem Quotienten der Emissions-Intensität des Reporter-Farbstoffes dividiert durch die Emissions-Intensität eines passiven Referenz-Farbstoffes. Unspezifische Einflüsse wie Konzentrationsänderungen auf Grund von Voluminaschwankungen (Pipettierfehler) können somit bis zu 10 % ausgeglichen werden.



**Abb. 3-38:** Amplifikationsplot: Das normalisierte Reportersignal  $R_n$  ist gegen die Zyklenzahl aufgetragen.

Im Amplifikationsplot war bereits zu erkennen, dass die unbekannten Proben erst nach dem Standard 200 Genome den Schwellenwert passieren.

**Tab. 3-3:** Ct-Werte und Standardabweichungen der unbekannten Proben

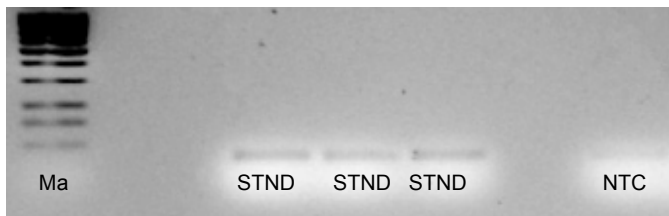
Name	Ct-Wert	Standard-abweichung Ct	Startkopien zahl	Mittelwert Startkopien zahl	Standard-abweichung Startkopienzahl
UHT-Milch 10 <sup>5</sup> KBE/ml Glasbead-Vortex	28.77	0.47	165.46	207.47	42.01
UHT-Milch 10 <sup>5</sup> KBE/ml Glasbead-Vortex	28.11	0.47	249.48	207.47	42.01
UHT-Milch 10 <sup>4</sup> KBE/ml Glasbead-Vortex	30.52	0.03	56.29	55.72	0.575
UHT-Milch 10 <sup>4</sup> KBE/ml Glasbead-Vortex	30.55	0.03	55.14	55.72	0.575
Name	Ct-Wert	Standard-abweichung Ct	Startkopien zahl	Mittelwert Startkopien zahl	Standard abweichung Startkopienzahl
UHT-Milch 5 x 10 <sup>3</sup> KBE/ml Ribo-lyser	30.18	0.55	69.6	60.24	9.36
UHT-Milch 5 x 10 <sup>3</sup> KBE/ml Ribo-lyser	30.68	0.55	50.87	60.24	9.36
UHT-Milch 5 x 10 <sup>2</sup> KBE/ml Ribo-lyser	31.28	0.55	35.16	28.9	6.26
UHT-Milch 5 x 10 <sup>2</sup> KBE/ml Ribo-lyser	31.99	0.05	22.64	28.9	6.26
NTC	32.06	0.05	21.72	11.62	10.11
NTC	36.37	0.04	1.51	11.62	10.11
NAC	40	0			

Die Negativkontrolle (NTC) zeigte ein geringes Signal, was auf eine Kontamination hindeutet. Die Amplifikationskontrolle (NAC), mit welcher man Fluoreszenzkontaminationen nachweisen kann, bleibt negativ. Solche Fluoreszenzkontaminationen können zum Beispiel durch die Benutzung von gepuderten Laborhandschuhen auftreten.

Es zeigte sich, wie sensibel die Reaktion ist. Obwohl ein Mastermix erstellt wurde, der Pipettierungenauigkeiten ausgleicht, gab es sich Schwankungen von bis zu über 50 Genomen. Im Agarosegel waren diese nicht zu erkennen. Jede Probe

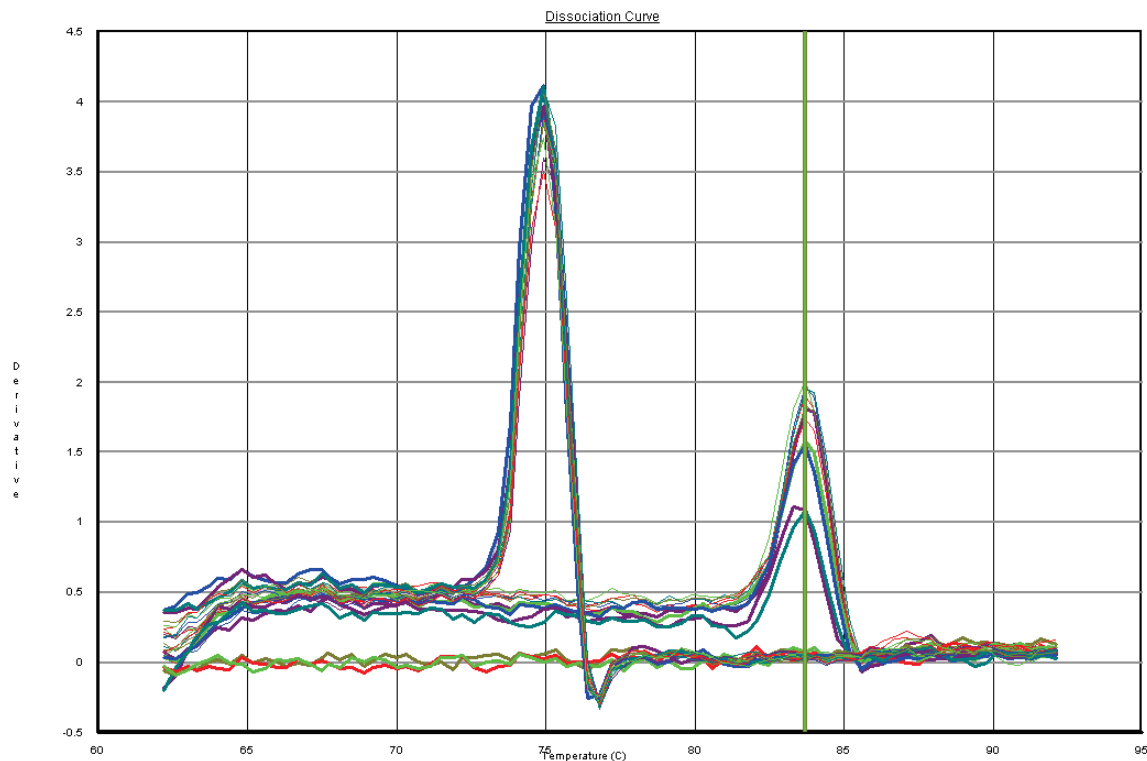
wird als Mehrfachbestimmung angesetzt, um diese Schwankungen miteinander zu verrechnen.

Im Anschluss an die PCR wurde das Amplifikat über ein Dissoziationsprotokoll aufgeschmolzen (15 s/95 °C; 20 s/60 °C; über 20 min ein langsamer Anstieg der Temperatur von 60 °C auf 95 °C). Die Dissoziationskurve diente als Amplifikationskontrolle (Virtuelles Gel), die Schmelztemperatur war für das jeweilige Amplifikat spezifisch. Zu Anfang der Experimente werden die PCR-Produkte jedoch zusätzlich konventionell mit einem Agarosegel überprüft.



**Abb. 3-39:** 3 % Agarosegel in TAE. Auftrag von Standard (STND) und Negativkontrolle PCR (NTC) nach SYBR-Green Real-Time PCR.

In Abb. 3-39 zeigte sich nach dem Auftrag auf ein Agarosegel auch eine schwache Bande bei der Negativkontrolle (NTC).



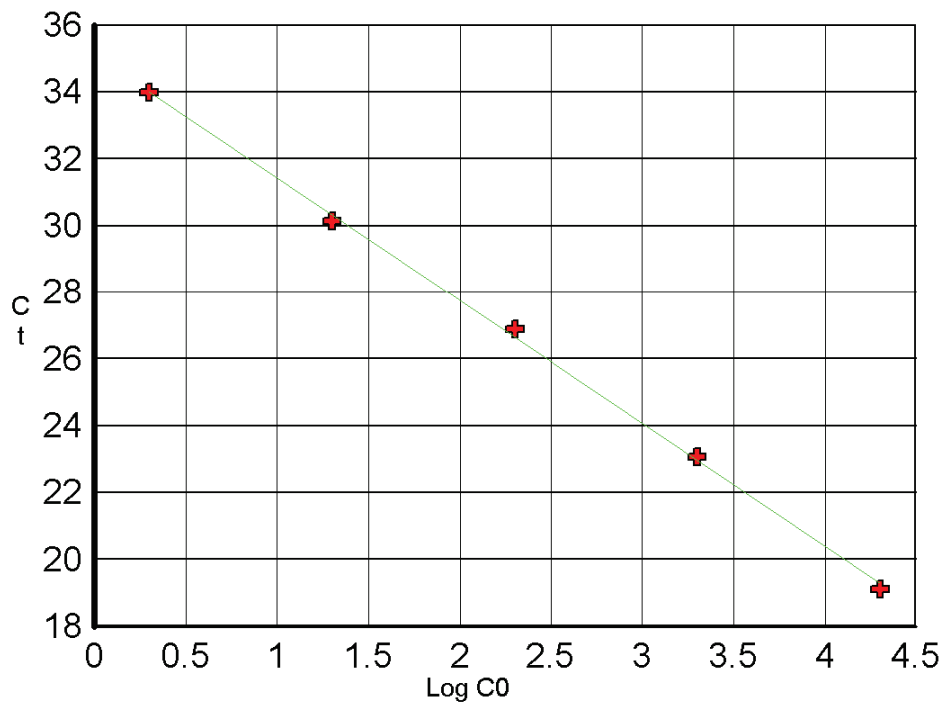
**Abb. 3-40:** Dissoziationskurve

Hier wurden die Unterschiede im Schmelztemperaturverlauf zwischen verschiedenen Amplifikaten deutlich. Der erste Peak stammte von einem anderen Test, der auf derselben Platte mitlief, im zweiten Peak ist das Amplifikat mit den IS900-Primern zu sehen, die Schmelztemperatur liegt bei 83,6 °C (Grüner Balken). Unterhalb der Peaks verläuft die Amplifikationskontrolle NAC. Primerdimere, welche vor dem Amplifikationspeak als kleine Erhebung zu finden wären, waren hier nicht zu erkennen. Die optimale Primerkonzentration wurde in Vorversuchen ermittelt. Die unterschiedliche Höhe der Peaks kommt durch die verschiedenen DNA-Konzentrationen (Standardreihe) zu Stande.

### Real-Time PCR mit Standard pIS900 mit TaqMan Chemie

Auch unter Verwendung des TaqMan Prinzips wurde ein Lauf mit dem Standard und „unbekannten“ Proben gemacht. Bei der TaqMan PCR fällt auf, dass der Mehrfachansatz der Proben unabdingbar ist. Einzelne Proben wichen derart ab, dass sie nicht für die Auswertung herangezogen werden konnten. Die TaqMan PCR scheint für Schwankungen anfälliger zu sein. Hingegen ist die Negativkontrolle der PCR (NTC: *No template control*) auch im Sechsfachansatz immer negativ. Die Verwendung der Sonde führt zu einer Erhöhung der Spezifität.

Die Spezifitätsprüfung des Primer/Sonden Systems erfolgte mit den unter 3.3 aufgeführten DNA-Isolaten. Dabei kam es auch bei der Verwendung von DNA nah verwandter Mykobakterien, wie *M. avium* subsp. *avium* nicht zu Kreuzreaktionen (o. Abb.).

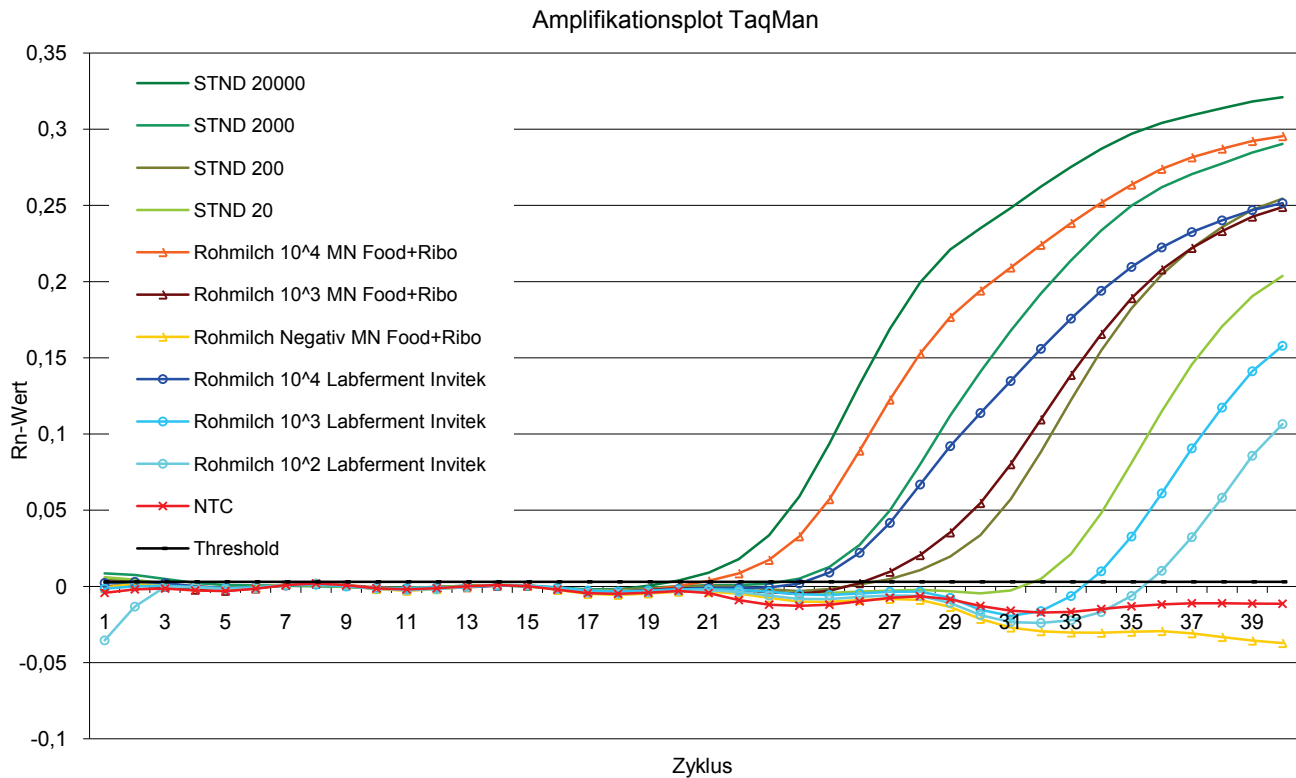


**Abb. 3-41:** Standardkurve mit pIS900 unter Verwendung der TaqMan Chemie. Standardkurve über Ct-Wert und Log0 der Startkopienzahl.

**Tab. 3-4:** Ct-Werte des Standards (Mittelwert)

Name	Ct-Wert	Genome
STND	19,23	20000
STND	23,07	2000
STND	26,89	200
STND	30,15	20
STND	34,21	2

Im Vergleich zur Standardkurve mit SYBR-Green zeigte sich das TaqMan Assay deutlich sensitiver. Die Standards wurden 1,4 bis 2 Ct-Werte früher detektiert, was einer Verbesserung der Nachweisgrenze um mindestens eine Verdünnungsstufe ( $\Delta Ct\ 1 = 1 \times \text{Verdünnung}$ ;  $\Delta Ct\ 3,3 = 10 \times \text{Verdünnung}$ ).



**Abb. 3-34:** „Amplifikationsplot“: Das normalisierte Reportersignal  $R_n$  ist gegen die Zyklenzahl aufgetragen. Treshold (Schwellenwert)

**Tab. 3-5:** Ct-Werte und Standardabweichungen TaqMan Assay

Name	Ct-Wert	Standard abweichung Ct	Startkopien zahl	Mittelwert Startkopien zahl	Standard abweichung Startkopien zahl
STND	19.73		20000		
STND	23.37		2000		
STND	26.47		200		
STND	31.75		20		
Rohmilch 10 <sup>4</sup> KBE/ml MN Food+Ribo	20.91	0.14	8513.3	9018.72	714.77
Rohmilch 10 <sup>4</sup> KBE/ml MN Food+Ribo	20.72	0.14	9524.15	9018.72	714.77
Rohmilch 10 <sup>3</sup> KBE/ml MN Food+Ribo	25.83	0.34	472.11	413.85	82.4
Rohmilch 10 <sup>3</sup> KBE/ml MN Food+Ribo	26.31	0.34	355.59	413.85	82.4
Rohmilch Negativmilch MN Food+Ribo	40	0			
Rohmilch 10 <sup>4</sup> KBE/ml Labferment Invitek	24.09	0.1	1309.98	1258.97	72.15
Rohmilch 10 <sup>4</sup> KBE/ml Labferment Invitek	24.23	0.1	1207.96	1258.97	72.15
Rohmilch 10 <sup>3</sup> KBE/ml Labferment Invitek	33.74	0.22	4.52	4.98	0.65
Rohmilch 10 <sup>3</sup> KBE/ml Labferment Invitek	33.42	0.22	5.43	4.98	0.65
Rohmilch 10 <sup>2</sup> KBE/ml Labferment Invitek	35.14	0.69	1.98	1.55	0.61
Rohmilch 10 <sup>2</sup> KBE/ml Labferment Invitek	36.11	0.69	1.12	1.55	0.61
NTC	40	0			

Als unbekannte Proben wurden DNA-Aufreinigungen aus Rohmilch nach verschiedenen Methoden aufgetragen. Dabei zeigte sich, dass nach der Extraktion mit dem NucleoSpin Food Kit (MN) aus den Verdünnungsstufen  $1 \times 10^4$  KBE/ml und  $1 \times 10^3$  KBE/ml mehr Startkopien nachgewiesen werden, als nach der Extraktion mit Labferment-Fällung (LF)/Invisorb Cell Spin Mini Kit (Inv). Mit dieser

Reinigung konnte also nicht so viel DNA gewonnen werden, wie mit der NucleoSpin Food Kit-Aufreinigung, die sich auch in der „normalen“ PCR als die sensitivere Aufreinigung gezeigt hat. Nicht kontaminierte Milch als Negativkontrolle (N) bleibt auch im TaqMan Assay negativ.



## 4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die DNA-Extraktion von *Mycobacterium paratuberculosis* aus verschiedenen Medien (Kultur, H-Milch, Rohmilch und Kolostrum) etabliert. Dabei stellte sich die DNA-Isolation aus der Flüssigkultur als unproblematisch dar. Es wurde eine einfache und schnelle Methode in Anlehnung an SANGUINETTI *et al.*, 1998 etabliert. Die Ermittlung der Zellzahl musste über die Kolonie-Bildenden Einheiten erfolgen, da ein Auszählen der Zellen, vor allem auf Grund ihrer Eigenschaft sich in Haufen/Klumpen zusammenzulagern, nicht möglich war.

Die DNA-Extraktion aus künstlich kontaminierter H-Milch gelang nach der Kombination aus mechanischer und chemischer Lyse mit der Nachweisgrenze von 1 KBE/ml. Im Vergleich zu MILLAR *et al.* 1996, der Nachweisgrenzen von 200-300 Zellen/ml, bzw. 50-2000 Zellen/ml H-Milch ermittelte, zeigt sich die von mir entwickelte Methode deutlich sensitiver.

Dagegen stellte sich der Nachweis aus künstlich kontaminierter Rohmilch als sehr kompliziert dar. Die mit H-Milch etablierten Methoden konnten hier nicht angewendet werden. Auch die in der Literatur beschriebenen Methoden zur Extraktion von Zellen oder DNA aus Rohmilch stellen sich als nicht sensitiv genug heraus. Die Nachweisgrenze des Testkitsystems sollte vergleichbar mit der Sensitivität des Goldstandards Kotkultur sein, die  $1 \times 10^2$  KBE/g [HALLDÓRSDÓTTIR *et al.* 2002] liegt.

Es gelang mit einer Vorbehandlung durch die mechanische Lyse im Ribolyser und der anschließenden Aufreinigung der DNA mit dem speziell angepassten NucleoSpin Food Kit (Macherey-Nagel) eine Nachweisgrenze von 10 KBE/ml Rohmilch zu etablieren. Damit wurde das Ziel eines sensitiven Nachweises von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* erreicht.

ODUMERU *et al*, 2001 beschreiben eine Methode, die mittels künstlich kontaminierter pasteurisierter Milch entwickelt wurde. Diese kontaminierte Milch wurde unmittelbar nach der Kontamination zentrifugiert, die Molke-Schicht entfernt und Sahne sowie Pellet zur DNA-Isolation vereinigt. Verschiedene Protokolle wurden in Kombination miteinander getestet, dabei erreichten die Autoren Nachweisgrenzen von  $10^5$  KBE/ml bis  $10^2$  KBE/ml.

Auf kommerzielle Kits verzichteten die Autoren, da sich die Phenol-Chloroform-Extraktion sensibler zeigte. Durch die Zugabe von 0,0037 % BSA zum PCR-Ansatz konnte die Nachweisgrenze weiter bis auf  $10^{-10^2}$  KBE/ml verbessert werden [ODUMERU *et al*, 2001].

Diese Methode wurde nicht mit nativ infizierter Milch getestet, daher ist ein Vergleich zu der hier entwickelten Methode schwierig. Die Autoren verwendeten zudem pasteurisierte Milch und keine Rohmilch. Die gewonnenen Ergebnisse sind daher nur bedingt auf Rohmilch übertragbar.

Bei eigenen Versuchen konnte aus künstlich kontaminierter ultrahocherhitzter Milch 1 Erreger/ml Milch nachgewiesen werden. Wurde die dieselbe Aufreinigungsmethode bei künstlich kontaminierter Rohmilch angewendet, wurde dagegen nur noch eine Nachweisgrenze von  $5 \times 10^3$  Erregern/ml Milch erreicht.

Zudem konzentrieren ODUMERU *et al*. die Zellen unmittelbar nach der künstlichen Kontamination durch Zentrifugation. Diese Vorgehensweise ist bei einem Testsystem nur bedingt geeignet. Zum einen besteht die Möglichkeit des Sensitivitätsverlusts durch Entfernen einer Milchfraktion, zum anderen erhöht sich mit dem zusätzlichen Schritt die Gefahr von Kreuzkontaminationen.

Im Gegensatz zu den Arbeiten von ODUMERU *et al* zeigten sich kommerzielle Kits zur Aufreinigung der DNA in den Versuchen zu dieser Arbeit deutlich sensibler, als die Phenol-Chloroform-Extraktion. Ein weiterer Vorteil bei der Verwendung von Kits, ist die Vermeidung der Verwendung von gesundheitsschädlichen Chemikalien, die einfachere und schnellere Handhabung und die bessere Reproduzierbarkeit.

Aus künstlich kontaminierter Tankmilch (Rohmilch) konnten PILLAI *et al.* 2002 sowohl durch Milchkultur auf Herrold's Egg Yolk Schrägagar, als auch über eine IS900 PCR noch 10-100 KBE/ml nachweisen. Dabei zeigte sich, dass die PCR nur stabil war (24/24 PCR Tests), wenn über 100 KBE/ml vorhanden waren. Bei 10 KBE/ml war das Ergebnis schwankend (12/24 PCR Tests). Zur Bestimmung der Nachweisgrenze wurden 50 ml Tankmilch mit verschiedenen Konzentrationen von *M. paratuberculosis* versetzt, die Milch anschließend zentrifugiert und die DNA aus dem entstandenen Pellet mit einem Kit (InstaGene Kit/Bio-Rad) aufgereinigt [PILLAI *et al.*, 2002].

Auch hier zentrifugieren die Autoren die Milch unmittelbar nach der Kontamination. Dadurch sollten sich fast alle *M. paratuberculosis*-Zellen im Pellet wiederfinden. Die erhaltene Nachweisgrenze der Autoren ist mit den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen vergleichbar.

Die Autoren GIESE und AHRENS (2000) konnte mit einer IS900 PCR *M. paratuberculosis* aus Rohmilch nur nachweisen, wenn die Konzentration über  $10^3$  KBE/ml lag. Wurde *M. paratuberculosis* aus der Rohmilch vorher kultiviert, konnten  $10^2$  KBE/ml mittels PCR nachgewiesen werden. Die Aufreinigung der Milch für die PCR erfolgt aus 18 ml Milch, bzw. nach der Zentrifugation aus dem erhaltenen Pellet. Das Pellet wurde gewaschen und mit Zirkoniumbeads im Beadbeater aufgebrochen. Zwei  $\mu$ l dieser Probe wurde direkt für die PCR eingesetzt.

Bei der in dieser Arbeit entwickelten Methode wird die Probe anderes als bei GIESE und AHRENS mit Proteinase K-Lysispuffer behandelt. Die DNA wird anschließend über eine Silica-Säule aufgereinigt. Dies scheint zur Verbesserung der Nachweisgrenze um 2 log-Stufen im Vergleich zu GIESE und AHRENS zu führen.

Mittels immunomagnetischer Separation [GRANT *et al.*, 1998] sollte es möglich sein, die Mykobakterien vor der Lyse zu konzentrieren und aus dem Inhibitoren-haltigen Medium Milch zu entfernen.

Bei eigenen Versuchen mit dieser Methode verklumpten sich die Magnetpartikel bei der Isolation aus Rohmilch mit der Sahneschicht und konnten nicht zurück gewonnen werden. Auch nach Entfernung der Sahneschicht konnte aus Rohmilch kein positives Ergebnis erzielt werden.

Bei der Isolation aus der Flüssigkultur konnten mit der IMS  $1 \times 10^4$  KBE/ml nachgewiesen werden, bei H-Milch sank die Nachweisgrenze auf  $1 \times 10^5$  KBE/ml. Prinzipiell funktionierte die Methode also auch mit dem in dieser Arbeit verwendeten Antikörper, dennoch konnten nicht dieselben Ergebnisse wie durch GRANT *et al.* 1998 & 2000 (10 KBE/ml) erzielt werden.

Eine mögliche Erklärung sind nach HALLDÓRÐÓTTIR *et al.* 2002 Inhibitoren, welche auch nach einer immunomagnetischen Separation im Eluat vorhanden sein könnten. Die Autoren führen dies auf eine nicht-spezifische Bindung von Inhibitoren an magnetische Beads zurück, welche dann ebenfalls eluiert werden.

Auch die Auswahl der Magnetbeads kann eine Rolle gespielt haben. Für diese Arbeit standen nur M-280 (2,8  $\mu\text{m}$ ) Beads, welche mit p-tuloenesulphonyl (tosyl) Gruppen versehen sind, zur Verfügung. Vom Hersteller werden für die Kopplung von Antikörpern M-450 (4,5  $\mu\text{m}$ ) Beads mit glycidyl ether (epoxyl) reaktiven Gruppen besonders empfohlen.

GRANT *et al.* 1998 verwenden ein polyklonales Kaninchen anti-*M. paratuberculosis* Serum, und koppeln die Antikörper an M-280 Beads, die bereits mit einem polyklonalen Serum aus dem Schaf gegen alle Antikörper aus Kaninchen beschichtet sind.

Es ist möglich dass die von den Autoren verwendete Antikörper-Antikörper-Bindung für das „Fischen“ der *M. paratuberculosis*-Zellen effektiver ist.

Die DNA-Extraktion aus Kolostrum erwies sich als sehr schwierig, als Nachweisgrenze konnten  $1 \times 10^4$  KBE/ml ermittelt werden. Kolostrum ist als Extraktionsmedium sehr verschieden im Vergleich zu Rohmilch. Beispielsweise können alle Inkubationsschritte unter Hitzeeinwirkung ( $> 80^\circ\text{C}$ ) nicht durchgeführt werden, da Kolostrum danach „schnittfest“ ist. Auf Grund des hohen Gehalts an Antikörpern, Vitaminen, Fetten, Mineralien und Wachstumsfaktoren ist es notwendig, für Kolostrum eine eigene, speziell angepasste Extraktionsmethode zu etablieren, die nicht Gegenstand dieser Arbeit war.

Von den Feldproben waren 8 von 26 (30,7 %) Rindern in der PCR mit mindestens einer Probe positiv. Hier wird die Notwendigkeit der Viertelgemelksprobe deutlich. Wie nachgewiesen werden konnte, können betroffene Rinder *M. paratuberculosis* auch nur in einem Euterviertel ausscheiden. Ein Pool der Viertelgemelksproben würde in diesem Fall zur Verdünnung der *M. paratuberculosis*-Konzentration beitragen und ein eventuell falsch-negatives Ergebnis wäre die Folge.

Nach bisherigen Erkenntnissen sollten positive Ergebnisse in der Kotkultur sehr gut mit der Ausscheidung des Organismus in Kolostrum oder Milch korrelieren [WHIPPLE *et al.*, 1992]. Der Erreger wird aber mit der Milch in geringerem Maße ausgeschieden, als mit dem Kot. Es wird von Fällen berichtet, in denen Kühe mit klinischen Symptomen und hoher Ausscheidungsrate im Kot nur weniger als 1 KBE/ml Milch ausscheiden [SWEENEY *et al.*, 1992].

Das bedeutet, dass Kot-positive Rinder *M. paratuberculosis* in so geringem Maße auch mit der Milch ausscheiden können, dass dies in der PCR nicht mehr nachweisbar ist.

Dies könnte erklären, warum nicht bei allen in der Feldstudie untersuchten Rindern, der PCR-Nachweis positiv war. Die Kühe schieden zum Zeitpunkt der Probenentnahme *M. paratuberculosis* nicht mit der Milch aus. Die Kotprobenent-

nahme erfolgte etwas 4 Monate zuvor, damit das Ergebnis der mikrobiologischen Untersuchung bei der Auswahl der Rinder mit einbezogen werden konnte.

Allgemein wird für die meisten PCR Nachweissystemen aus Lebensmitteln ein Detektionslimit von  $10\text{-}10^4$  KBE/g erreicht [SCHEU *et al.*, 1998]. Nicht nur das verwendete Nachweissystem hat Einfluss auf die erreichbare Sensitivität, sondern auch das Lebensmittel, aus dem die DNA extrahiert wird. Zum Beispiel gilt Käse als extrem schwieriges Medium. Hier wird nur ein Detektionslimit von  $2 \times 10^8$  KBE/g auf Grund der vorhandenen PCR-Inhibitoren erreicht.

Im Vergleich zu kulturellen Methoden zum Nachweis von pathogenen Mikroorganismen aus Milchprodukten ist die PCR allgemein sensitiver [ALLMANN *et al.* 1995]. Dies hängt damit zusammen, dass viele Zellen nicht kultivierbar oder lebensfähig sind, aber mit DNA-Hybridisierungsmethoden nachgewiesen werden können [PEDERSEN and JACOBSEN, 1993].

Die Differenzierung zwischen kultivierbar und nicht-kultivierbar, aber lebensfähigen Organismen ist zwar möglich [BEJ *et al.* 1991, DE WIT *et al.* 1991], im Falle des *Mycobacterium paratuberculosis*-Nachweises sollten aber auch nicht kultivierbare Zellen, die als möglicherweise nicht lebensfähig angesehen werden, als infektiös gelten.

Im Fall der Morbus Crohn Erkrankung ist selten gelungen, *M. paratuberculosis* kulturell nachzuweisen. In der PCR-Untersuchung konnte aber das *M. paratuberculosis* spezifische Element IS900 nachgewiesen werden [PAVLÍK *et al.*, 1995, FRANCOIS *et al.*, 1997; SANDERSON *et al.*, 1993; WALL *et al.*, 1993]. Auch zeigen neuere Untersuchungen dass *M. paratuberculosis* bei Morbus Crohn Patienten in den Sphäroblasten vorliegt [MOSER, 2002].

Der Erreger scheint dadurch seine Säurefestigkeit zu verlieren. Damit ist er nicht mehr anfärbbar und ein Nachweis über die Ziehl-Neelsen-Färbung ist dadurch nicht mehr möglich. Eine IS900-PCR identifiziert ihn aber als *M. paratuberculo-*

sis. Zudem ist die Biochemische Reaktivität von *M. paratuberculosis* auf Grund der beschränkten Zellwandpermeabilität verändert [CHIODINI *et al.*, 1986].

Gelingt der kulturelle Nachweis des Erregers aus Morbus Crohn Patienten, waren dazu meist 18-30 Monate Inkubation in einem Spezialnährmedium notwendig [MARKESICH *et al.*, 1988].

Wenn aus boviner Milch *Mycobacterium paratuberculosis* mittels molekularbiologischen Methoden nachweisbar ist, muss von einer Infektion ausgegangen werden, die möglicherweise auch auf den Menschen übertragbar ist, auch wenn ein kultureller Nachweis nicht oder nur sehr schlecht möglich ist.

Zur Quantifizierung der DNA wurden in der vorliegenden Arbeit eine kompetitive PCR und eine Real-Time-PCR entwickelt. Die dafür notwendigen Standards wurden durch Insertion von IS900 in ein Plasmid hergestellt. Da die kompetitive PCR nur zur Abschätzung der Kopienzahl dienen kann, wurde diese Methode nicht weiter ausgebaut.

Wesentlich einfacher in der Handhabung und zudem sehr viel genauer ist die Real-Time-PCR auf der Basis des TaqMan-Prinzipes. Durch die Verwendung einer Sonde, die auf dem Amplifikat bindet, ist eine hohe Spezifität gewährleistet. Das SYBR-Green Verfahren zeigte sich im Vergleich zum TaqMan Verfahren weniger sensitiv, was im Funktionsprinzip des Nachweisverfahrens begründet ist. SYBR-Green bindet an alle doppelsträngige DNA, auf Grund dessen kommt es zu einem höheren Hintergrund und deshalb zu einer höheren Nachweisgrenze.

Beim der Sondenentwicklung des TaqMan Tests musste auf den komplementären Strang ausgewichen werden. Auf dem Leitstrang konnten die optimalen Reaktionsbedingungen nicht erfüllt werden. Die Überprüfung der Spezifität fand mit den bereits in der normalen PCR verwendeten DNA-Isolaten der zwölf verschiedenen Erreger statt.

Auch mit den nah verwandten Mykobakterien *M. marinum* und *M. scrofulaceum* konnte keine Kreuzreaktionen nachgewiesen werden, was für eine gute Spezifität der entwickelten Methode spricht.

KIM *et al.*, 2002 entwickelten eine Real-Time-PCR (TaqMan) zum Nachweis von *M. paratuberculosis* aus bovinem Kot. Als Standard verwenden die Autoren eine 10er log-Verdünnungsreihe von genomischer DNA. Isolate aus *M. marinum* und *M. scrofulaceum* zeigen sich mit diesem Primersystem ebenfalls positiv [KIM *et al.*, 2002]. Da die Genauigkeit der Quantifizierung stark von der Qualität des Standards abhängt, ist dieses System deshalb kritisch zu betrachten.

Von der Verwendung von genomischer DNA zur Quantifizierung wird auch vom Hersteller des Detektionssystems (Applied Biosystems) abgeraten. Die Quantifizierung von genomischer DNA ist auf Grund ihrer Sekundärstrukturen oft ungenau, auch ist sie weniger stabil (Scherkräfte) und ihre Aufreinigung komplizierter. Bei Kreuzreaktionen zu anderen Mykobakterien sollte das Primer/Sondensystem auf einen anderen Abschnitt von IS900 gelegt werden.

Fraglich bleibt aber die Relevanz dieser Kreuzreaktionen. Der Erreger der Fischtuberkulose (*M. marinum*) wurde noch nicht aus Rindern isoliert. Auch *M. scrofulaceum*, den man hauptsächlich aus verändertem Lungengewebe beim Menschen, gelegentlich auch beim Schwein oder aus dem Boden isolieren kann, kommt bei Rindern selten vor.

Wie bereits dargestellt, verwenden die meisten Autoren für die PCR das Insertionselement IS900, andere Sequenzen sind für *M. paratuberculosis* zwar ebenfalls spezifisch (z. B. die heat shock Proteine *hsp65* und *hspX*), werden aber kaum verwendet.

In einer Veröffentlichung von ENGLUND *et al.* 2002 wird bezweifelt, ob die Sequenz IS900 wirklich spezifisch für *M. paratuberculosis* ist, dies würde IS900 dann für die Diagnostik ungeeignet machen. Diese Arbeitsgruppe isolierte aus der Kotkultur eines gesunden schwedischen Rindes eine einzelne Kolonie, die zu



Beginn für *M. paratuberculosis* gehalten wurde. Sie war nach einer IS900 PCR mit den Primern p36/p11 [ENGLUND *et al.* 1999] positiv.

In der Ziehl-Neelsen-Färbung zeigten sich säurefeste Stäbchen, die sich im Vergleich zu *M. paratuberculosis* aber länger und schlanker darstellten und leicht geneigt waren. Dies ist nicht typisch für *M. paratuberculosis*. In der Subkultur zeigte sich der Stamm nicht Mycobactin-abhängig und war stark gelb-orange pigmentiert, ein Wachstum war bei 37 °C nicht möglich, das beste Wachstum wurde bei 30 °C erzielt. Nach phänotypischen Vergleichen und 16S rRNA Sequenzvergleichen zeigte sich, dass dieser (Stamm 2333) eine enge Verwandtschaft zu *Mycobacterium cookii* aufweist, möglicherweise handelt es sich um eine neue Mykobakterien Spezies [ENGLUND *et al.* 2002].

Die IS900-ähnliche Sequenz weist in der Position 28-1071 von IS900 zu 94,4 % dieselbe Sequenz auf, was einem Unterschied von 58 Nukleotide entspricht. In den ersten 450 Basen, wo die meisten Primer binden, sind nur 6 Basen Unterschied zu IS900. Der in dieser Arbeit verwendete Primer s749 (Stina-749R) [ENGLUND *et al.* 1999] weist zwei Fehlpaarungen auf, die aber eine Amplifikation nicht verhindern [ENGLUND *et al.* 2002].

Mit Primern für die *M. paratuberculosis* Sequenz f57 [COETSIER *et al.* 2000] konnte aus dem Stamm 2333 kein Amplifikat erzeugt werden. Die Sequenz f57 ist ebenfalls für *M. paratuberculosis* spezifisch, kommt aber im Gegensatz zu IS900 nur einmal pro Genom vor.

Trotz dieser neuen Erkenntnisse halte ich die IS900-PCR weiterhin für ein geeignetes Mittel um *M. paratuberculosis* nachzuweisen. Da IS900 im Genom 15-20 mal vorliegt, wird eine Signalverstärkung erreicht. Auf Grund der oft sehr geringen Erregeranzahl, die ausgeschieden wird, kann auf diese Verstärkung zur Diagnose von *M. paratuberculosis* nicht verzichtet werden. Der Stamm 2333 wächst, wie *M. cookii*, zudem bei 37 °C nur sehr schlecht oder gar nicht. Eine intrazelluläre Vermehrung würde deshalb schlecht bzw. gar nicht stattfinden.

Immer wieder scheiden Rinder atypische, nicht-pathogene Mykobakterien aus, die auch in der Kotkultur nachgewiesen werden, jedoch aber ohne Bedeutung für die Diagnostik sind. Meist wachsen diese Kolonien auch sehr früh heran (3-4 Wochen), so das *M. paratuberculosis* (wächst frühestens ab 5. Woche) ausgeschlossen werden kann. Für den geübten Betrachter ergeben sich, wie beschrieben, morphologische Unterschiede nach der Ziehl-Neelsen-Färbung.

Das ein positives Milch-PCR Ergebnis eigentlich Stamm 2333 und nicht *M. paratuberculosis* ist, halte ich für sehr unwahrscheinlich. Sicher wäre dieses Problem dann auch schon früher aufgefallen, da viele Autoren bereits vor der PCR oder auch parallel dazu eine Kultur aus Milch, Kot oder Käse von subklinisch oder klinisch infizierten Rindern anlegen [SINGH *et al.* 2007; RUZANTE *et al.* 2006; KIM *et al.* 2002; SPAHR und SCHAFROTH, 2001; GIESE und AHRENS, 2000; STREETER 1995; SWEENEY *et al.*, 1992].

Zudem ist bei der Untersuchung von Milch für die Verwendung als Lebensmittel oder als Testmatrix bei der Sanierung von betroffenen Betrieben, ein eventuell falsch positives Ergebnis, welches auch nur äußerst selten auftritt, nicht so kritisch zu bewerten, wie der Schaden, der durch ein falsch negatives Ergebnis entstehen würde.

Die Paratuberkulose wird auch in den nächsten Jahrzehnten ihre wichtige Rolle in der veterinärmedizinischen Diagnostik behalten. Die Ausrottung dieser Krankheit kann nur über die Aufzucht gesunder Kälber erfolgen. Die Hauptursache für Neuinfektionen von Rinderherden ist der Zukauf ohne vorherige Untersuchung und Quarantäne. Auch von den Zuchtverbänden wird bei Auktionen keine Paratuberkulose-Untersuchung der angebotenen Tiere durchgeführt.

Neben dem Eintrag über infizierte Rinder kann auch ein Eintrag über infizierte andere Hauswiederkäuer [MUSKENS *et al.*, 2001] (Schafe als Reservoir) und Wildwiederkäuer [PAVLIK *et al.*, 2000] erfolgen. *M. paratuberculosis* kann auch bei anderen Wildtieren, z.B. bei Kaninchen vorkommen [BEARD *et al.*, 2001a und

GREIG *et al.*, 1999] und es wurde gezeigt, dass eine Infektion von Rindern mit einem *M. paratuberculosis*-Isolat aus Kaninchen möglich ist [BEARD *et al.*, 2001].

Auch die Kontamination von Weideflächen könnte bei der Neuinfektion eine wichtige Rolle spielen. So wurde aus Nematodenlarven *M. paratuberculosis* isoliert [WHITTIGTON *et al.*, 2001], woraus abzuleiten ist, dass der gemeinsame Weidegang von Jung- und Alttieren ebenfalls ein potentielles Risiko beinhaltet.

Die gewonnenen Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass ein sensitiver Nachweis von *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* aus Rohmilch möglich ist. In künstlich kontaminierter Rohmilch lag die ermittelte Nachweisgrenze bei 30 KBE/ml in der einfachen PCR und bei 3,7 KBE/ml in der nested PCR. In der nested PCR kann *M. paratuberculosis* bis 100 KBE/ml sicher nachgewiesen werden. Bei 80 % der Proben ist ein Nachweis bis unter 10 KBE/ml möglich.

## 5. Zusammenfassung

Die Paratuberkulose ist eine chronische Darmentzündung bei Wiederkäuern und wird durch das säurefeste Bakterium *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* verursacht. Die Tiere infizieren sich meist in den ersten Lebensmonaten, zeigen dann aber oft über Jahre keine klinischen Symptome. Der Erreger wird über den Kot und die Milch ausgeschieden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein molekularbiologisches Nachweisverfahren zur Detektion des Erregers mittels PCR-Techniken aus Rohmilch etabliert. Die DNA-Extraktion aus Rohmilch erfolgte nach mechanischer Zellertrümmerung über einen Silica-Membran-basierten Extraktionskit. Auf Basis der Sequenz eines für *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* spezifischen Insertions-elements (IS900) wurde eine single-, nested- und Real-Time PCR etabliert.

Über die Aufreinigung von künstlich kontaminierter Rohmilch wurde die Sensitivität des Verfahrens ermittelt. Die ermittelte Nachweisgrenze lag bei 30 KBE/ml Rohmilch in der single-PCR und bei 3,7 KBE/ml Rohmilch in der nested PCR. In der nested PCR konnte *M. paratuberculosis* bis 100 KBE/ml Rohmilch sicher nachgewiesen werden. Bei 80 % der Proben war ein Nachweis bis unter 10 KBE/ml möglich.

In einer Felduntersuchung wurden 26 Milchproben als Viertelgemelksproben gewonnen und mit single- und nested PCR untersucht. Hier zeigten sich 8 von 26 (30,7 %) Rindern in mindestens einer Viertelgemelksprobe positiv auf *M. paratuberculosis*. Da gezeigt wurde, dass der Erreger nicht aus allen Eutervierteln zugleich ausgeschieden wird, ist auch weiterhin die Verwendung von Viertelgemelksproben notwendig.

Durch den Einsatz eines Plasmidstandards wurde ein Real-Time-PCR Nachweis auf der Basis von IS900 entwickelt. Das Primer-Sonden-System zur Verwendung der TaqMan Technologie amplifiziert ein 76 bp Fragment.

Um Proben-DNA und Kontroll-DNA in einer PCR Reaktion zugleich nachweisen zu können, wurde zudem eine kompetitive PCR etabliert.

Mit dem in dieser Arbeit entwickelten Testsystem steht ein schneller, spezifischer und sensibler Nachweis der Paratuberkulose aus Rohmilch zur Verfügung.

## 6. Summary

Paratuberculosis is a chronic intestinal inflammation in ruminants caused by infection with the acid-fast microorganism, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Cattle are usually infected during the first months of life. Although, the pathogen is shed within faeces and milk, infected animals may not show any clinical signs for years after the primary infection.

In our study fast and sensitive PCR-based screening method was developed, to detect the presence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in raw milk. DNA extraction was carried out with a silica-membran-based method, after mechanical cell disruption.

PCR-amplification targeted IS900, a multicopy DNA insertion sequence specific for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. A single, nested- and Real-Time PCR was established.

The sensitivity of the method was determined using *Mycobacterium paratuberculosis* -spiked probes. The detection limit was 30 CFU/ml for single PCR and 3.7 CFU/ml for nested PCR (n=10-15, Median). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* could detect consistently up to 100 CFU/ml in the nested PCR. Less than 10 CFU/ml were even detectable in 80 % of the samples.

A total of 26 milk probes were collected as udder quarter samples from a farm with a high rate of Paratuberculosis. Each sample underwent single and nested-PCR-testing, respectively. 8 of 26 cattle's (30.7 %) were positive in at least one udder quarter sample. It was shown, that the pathogen is not present simultaneously at the same time in all udder quarters.

A real-time PCR method was developed to quantitative *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA using a IS900 plasmid standard. The primer-probe system for the use of TaqMan technology amplified a 76 bp fragment. In addition, a competitive PCR was established to amplify sample-DNA and quantified control-DNA within a single PCR-reaction.

A fast, specific and sensitive system for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk was developed.

## 7. Literaturverzeichnis

ABBAS B, RIEMANN HP (1988): IgG, IgM and IgA in the serum of cattle naturally infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **11**: 171-175

AHOKAS H, ERKKILA MJ (1993): Interference of PCR amplification by the polyamines, spermine and spermidine. *PCR Methods Appl.* **3**: 65-68

ALLMANN M, HÖFELEIN C, KÖPPEL E, LÜTHY J, MEYER R, NIEDERHAUSER C, WEGMÜLLER B, CANDRIAN U. (1995): Polymerase chain reaction (PCR) for detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy products. *Res Microbiol.* 1995 **146**: 85-97.

ATTAL J, CAJERO-JUAREZ M, HOUEBINE, LM (1995): A simple method of DNA extraction from whole tissues and blood using glass powder for detection of transgenic animals by PCR. *Transgenic Res.* **4**: 149-150

BANG O, ANDERSEN CW (1913): Einige Untersuchungen über komplementbindende Antistoffe bei experimenteller und spontaner Tuberkulose sowie paratuberkulöser Darmentzündung des Rindes. *Zbl Bakt Hyg I Abt Orig* **69**: 517-538

BAUERFEIND R, BENAZZI S, WEISS R, SCHLIESSER T, WILLEMS H, BALJIER G (1996): Molecular Characterization of *Mycobacterium paratuberculosis* Isolates from sheep, goats, and cattle by Hybridization with a DNA Probe to Insertion Element IS900. *J Clin Microbiol* **34**: 1617-1621

BECH-NIELSEN S, JØRGENSEN JB, AHRENS P, FELD NC (1992): Diagnostic accuracy of a *Mycobacterium phlei*-absorbed serum ELISA for diagnosis of bovine paratuberculosis in dairy cows. *J Clin Microbiol* **30**: 613-618

BELLETTI G, ARRIGONI N, SALI G (1992): Johne's disease in cattle: clinical and epidemiological investigations and experiences of a control program. *Tierärztl Umschau* **47**: 328-330

BENDIXEN PH (1977): Immunologic reactions caused by infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *A Rev Nord Veterinarmed* **30**: 163-168

BENEDICTUS G, VERHOEFF J, SCHUKKEN YH, HESSELINK JW (2000): Dutch paratuberculosis programme history, principles and development *Veterinary Microbiology* **77**: 399-413

Bej AK, Mahbubani MH, Atlas RM (1991): Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. *Appl Environ Microbiol.* **57**: 597-600

BILLMAN-JACOB H, CARRIGAN M, COCKRAM F, CORNER LA, GILL IJ, HILL JF, JESSEP T, MILNER AR, WOOD PR (1992): A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. *Aust Vet J* **69**: 25-28

BISPING W, AMTSBERG G (1988): Farbatlas zur Diagnose bakterieller Infektionserreger der Tiere. *Verl. Parey, Berlin, Hamburg*: 119-120

BOSE M, CHANDER A, DAS RH (1993): A rapid and gentle method for the isolation of genomic DNA from mycobacteria. *Nucl Acids Res* **21**: 2529-2530

BULL TJ, HERMON-TAYLOR J, PAVLIK I, EL-ZAATARI F, TIZARD M (2000): Characterization of IS900 loci in *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and development of multiplex PCR typing. *Microbiology* **146**: 2185-2197

BURNHAM WR, LENNARD-JONES JE, STANFORD JL, BIRD RG (1978): Mycobacteria as a possible cause of inflammatory bowel disease. *The Lancet* **30**: 693-696

CARDULLO RA, AGRAWAL S, FLORES C, ZAMECNIK PC, WOLF DE (1988): Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Sci USA* **85**: 8790-8794

CAVE H, MARIANI P, GRANDCHAMP B, ELION J, DENAMUR E (1994): Reliability of PCR directly from stool samples: usefulness of an internal standard. *Bio-Techniques* **16**: 809-810

CERF O, GRIFFITHS M, AZIZA F. (2007): Assessment of the prevalence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in commercially pasteurized milk. *Foodborne Pathog Dis.* **4** (4): 433-447

CHIODINI RJ, DAVIS W (1992): The cellular immunology of bovine paratuberculosis: the predominant response is mediated by cytotoxic gamma/delta T lymphocytes which prevent CD4<sup>+</sup> activity. *Microbial Pathogen* **13**: 447-463

CHIODINI RJ, VAN KRUININGEN HJ, MERKAL R. S. (1984): Ruminant Paratuberculosis (Johne's disease):- The current status and future prospects. *Cornell Veterinarian* **74**: 218-262

CHIODINI RJ, VAN KRUININGEN HJ, THAYER WR, COUTU JA (1986): Spheroplastic phase of mycobacteria isolated from patients with Crohn's disease. *J Clin Microbiol* **24**: 357-363

CHIODINI RJ (1983): Abolish *Mycobacterium paratuberculosis* strain 18 [letter; comment]. *J Clin Microbiol* **31**: 1956-1958

CLARKE CJ, PATTERSON IA, ARMSTRONG KE, LOW JC (1996): Comparison of the absorbed ELISA and agar gel immunodiffusion test with clinicopathological findings in ovine clinical paratuberculosis. *Vet Rec* **139**: 618-621

COCITO C, GILOT P, COENE M, DE KESEL M, POUPART P, VANNUFFEL P (1994): Paratuberculosis. *Clin Microbiol Rev* **7**: 328-345

COETSIER C, VANNUFFEL P, BLONDEEL N, DENEJF J, COCITO C, GALA J (2000): Duplex PCR for Differential Identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium* subsp. *paratuberculosis* in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissues from Cattle. *J Clin Microbiol* **38**: 3048-3054



COLE ST, BROSCHE R, PARKHILL J, GARNIER T, CHURCHER C, HARRIS D, GORDON SV, EIGLMEIER K, GAS S, BARRY CE, TEKAIA F, BADCOCK K, BASHAM D, BROWN D, CHILLINGWORTH T, CONNOR R, DAVIES R, DEVLIN K, FELTWELL T, GENTLES S, HAMLIN N, HOLROYD S, HORNSBY T, JAGELS K, KROGH A, MCLEAN J, MOULE S, MURPHY L, OLIVER K, OSBORNE J, QUAIL MA, RAJANDREAM MA, ROGERS J, RUTTER S, SEEGER K, SKELTON J, SQUARES R, SQUARES S, SULSTON JE, TAYLOR K, WHITEHEAD S, BARRELL BG (1998): Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* **393**: 537-544

COLLINS MT, SOCKET DC (1993): Accuracy and economics of the USDA-licensed enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis. *J Am Vet Med Assoc* **203**: 1456-1463

COLLINS MT, SOCKETT DC, RIDGE S, COX JC (1991): Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for Johne's disease. *J Clin Microbiol* **29**: 272-276

COLLINS DM, HILBINK F, WEST DM, HOSIE BD, COOKE MM, DeLISLE GW (1993): Investigation of *Mycobacterium paratuberculosis* in sheep by fecal culture, DNA characterisation and the polymerase chain reaction. *Vet Rec* **133**: 599-600

COLLINS MT (1996): Diagnosis of paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* **12**:357-372

CORTI S, STEPHAN R (2002): Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* specific IS900 insertion sequences in bulk-tank milk samples obtained from different regions throughout Switzerland. *BMC Microbiology* **2**: 15-21

De KESEL MP, GILOT P, MISONNE M, COENE M, COCITO C (1993): Characterization and expression of portions of the 34-kilodalton-protein gene of *Myco-*

*bacterium paratuberculosis*: Its application to serological analysis of Johne's disease. *J Clin Microbiol* **31**: 947-954

DEMEKE T, ADAMS R (1992): The effect of plant polysaccharides and buffer additives on PCR. *BioTechniques* **12**: 333-334

DE WIT MY, FABER WR, KRIEG SR, DOUGLAS JT, LUCAS SB, MONTREEWASUWAT N, PATTYN SR, HUSSAIN R, PONNIGHAUS JM, HARTSKEERL RA, et al. (1991): Application of a polymerase chain reaction for the detection of *Mycobacterium leprae* in skin tissues. *J Clin Microbiol.* **29**: 906-10

DOYLE TM (1956): Johne's disease. *Veterinary Record* **68**: 869-878

EGAN J, WEAVERS E, O'GRADY D (1999): An evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in cattle. *Irish Vet J* **52**: 86-89

ELLINGSON JL, STABEL JR, BISHAI WR, FROTHINGHAM R, MILLER JM (2000): Evaluation of the accuracy and reproducibility of a practical PCR panel assay for rapid detection and differentiation of *Mycobacterium avium* subspecies. *Mol Cell Probes* **14**: 153-161

ENGLUND S, BALLAGI-PORDÁNY A, BÖLSKE G, JOHANSSON K (1999): Single PCR and Nested PCR with a Mimic Molecule for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Diagn Microbiol Infect Dis* **33**: 163-171

ENGLUND S, BÖLSKE G, JOHANSSON K (2002): An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* **209**: 267-271

ERIKS I. S, MUNCK KT, BESSER TE, CANTOR GH, KAPUR V (1996): Rapid Differentiation of *Mycobacterium avium* and *M. paratuberculosis* by PCR and Restriction Enzyme Analysis. *J Clin Microbiol* **34**: 734-737

FLUIT AC, TORENSMA R, VISSER MJ, AARSMAN CJ, POPPELIER MJ, KELLER BH, LAPWIJK P, VERHOEF J (1993): Detection of *Listeria monocytogenes* in cheese with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. *Appl Environ Microbiol* **59**: 1289-1293

FRANCOIS B, KRISHNAMOORTHY R, ELION J (1997): Comparative study of *Mycobacterium paratuberculosis* strains isolated from Crohn's disease and Johne's disease using restriction fragment length polymorphism and arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Epidemiol Infect* **118**: 227-233

FURRER B, CANDRIAN U, HOEFELEIN CH, LUE-THY J (1991): Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by *in vitro* amplification of haemolysin gene fragments. *J Appl Bacteriol* **70**: 372-379

GARRIDO JM, CORTABARRIA N, OGUIZA JA, ADURIZ G, JUSTE RA (2000): Use of a PCR method on fecal samples for diagnosis of sheep paratuberculosis. *Vet Microbiol* **77**: 379-386

GIESE SB, AHRENS P (2000): Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk from clinically affected cows by PCR and culture. *Vet Microbiol* **77**: 291-297

GILOT P, COCITO C (1993): Comparative analysis of three sensitins used in cutaneous testing for tuberculosis and paratuberculosis in cattle. *FEMS Microbiol Lett* **110**: 307-312

GITNICK G, COLLINS J, BEAMAN B, BROOKS D, ARTHUR M, IMAEDA T, MALIESCHESKY M (1998): Preliminary report on isolation of mycobacteria from patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* **34**: 925-932

GOLSTEYN THOMAS EJ, KING RK, BURCHAK J, GANNON VP (1991): Sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* in milk and ground beef

samples with the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol* **57**: 2576-2580

GRAHAM DY, MARKESICH DC, YOSHIMURA HH. (1987): Mycobacteria and inflammatory bowel disease. Results of culture. *Gastroenterology*. **92**: 436-442  
71

GRANT IR, BALL HJ, ROWE MT (1998): Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from Milk by Immunomagnetic Separation. *Appl Env Microbiol* **64**: 3153-3158

GRANT IR, POPE CM, O'RIORDAN LM, BALL HJ, ROWE MT (2000): Improved detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in milk by immunomagnetic PCR. *Vet Microbiol* **77**: 369-378

GREEN EP, TIZARD M, MOSS MT, THOMSOM J, WINTERBORNE DJ, MCFADDEN JJ, HERMON-TAYLOR J (1989): Sequence and characteristics of IS 900, an insertion element identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Nucleic Acids Res* **17**: 9063-9073

HALLDÓRSDÓTTIR S, ENGLUND S, FREDSVOLD NILSEN S, OLSAKER I (2002): Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by buoyant density centrifugation, sequence capture PCR and dot blot hybridisation. *Vet Microbiol* **87**: 327-340

HERMAN L, DE RIDDER H (1993): Cheese components reduce the sensitivity of detection of *Listeria monocytogenes* by the polymerase chain reaction. *Neth Milk Dairy J* **47**: 23-29

HERMON-TAYLOR J, BARNES N, CLARKE C, FINLAYSON C (1998): Mycobacterium paratuberculosis Cervical Lymphadenitis followed five years later by terminal ileitis similar to Crohn's Disease. *BMJ* **316**: 449-453

HILBINK F, WEST DM, DE LISLE GW, KITTELBERGER R, HOSIE BD, HUTTON J, COOKE MM, PENROSE M (1994): Comparison of a complement

fixation test, a gel diffusion test and two absorbend and unabsorbed ELISAs for the diagnosis of paratuberculosis in sheep. *Vet Microbiol* **41**: 107-116

HOFFMANN, A (2002): Leiter der Abteilung Biochemie am fzmb-diagnostik, mündliche Mitteilung

HOLLAND PM, ABRAMSOM RD, WATSON R, GELFAND DH (1991): Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7276-7280

HOMUTH M; Innovative Veterinärdiagnostik GmbH, Tierärztliche Hochschule Hannover. Mündliche Mitteilung bei Tagung: Gesunde Rinderbestände – Voraussetzung für Verbraucherschutz und Wirtschaftlichkeit, Pfiffelbach, 22.11.2001

HUTCHINSON LJ (1996): Economic impact of paratuberculosis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim Pract.* **12**: 373-81

JARK U, RINGENA I, FRANZ B, GERLACH GF, BEYERBACH M, FRANZ B (1997): Development of an ELISA technique for serodiagnosis of bovine paratuberculosis. *Vet Microbiol* **57**: 189-198

JIN C, MATA M, FINK DJ (1994): Rapid construction of deleted DNA fragments for use as internal standards in competitive PCR. *PCR Methods Appl* **3**: 252-255

JORGENSEN JB (1977): Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. *Nord Vet Med* **29**: 267 - 270

KAPPERUD G, VARBUND T, SKJERVE E, HORNES E, MICHAELSEN TE (1993): Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in foods and water by immunomagnetic separation, nested polymerase chain reactions, and colorimetric detection of amplified DNA. *Appl Environ Microbiol* **59**: 2938-2944

KATCHER HL, SCHWARTZ I (1994): A distinctive property of *Tth* DNA polymerase: enzymatic amplification in the presence of phenol. *BioTechniques* **16**: 84-92

KHAN G, KANGRO HO, COATES P. J, HEATH R.B. (1991): Inhibitory effects of urine on the polymerase chain reaction for cytomegalovirus DNA. *J Clin Pathol* **44**: 360-365

KIM SG, SHIN SJ, JACOBSON RH, MILLER LJ, HARPENDING PR, STEHMAN SM, ROSSITER CA, LEIN DA (2002): Development and application of quantitative polymerase chain reaction assay based on the ABI 7700 system (TaqMan) for detection and quantification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *J Vet Diagn Invest* **14**: 126-131

KOLK AH, NOORDHOEK GT, DE LEEUW O, KUIJPER S, VAN EMBDEN JD (1994): *Mycobacterium smegmatis* strain for detection of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR used as internal control for inhibition of amplification and for quantification of bacteria. *J Clin Microbiol* **32**: 1354-1356

KÖRMENDY B (1990): Paratuberculosis in a cattle herd: Comparison of allergic, serologic and faecal microscopic tests. *Acta Microbiol Hungarica* **37**: 219-222

LARSEN AB, MERKAL RS, VARDAMAN TH (1956): Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Am J Vet Res* **17**: 549-551

LINDAHL T, SEDGEWICK B, NAKABEPPU Y (1988): Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents. *Annu Rev Biochem* **57**: 133-157

LIVAK KJ, FLOOD SJ, MARMARO J, GIUSTI W, DEETZ K (1995): Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* **4** (6): 357-362

MARKESICH D, GRAHAM D, YOSHIMURA H (1988): Progress in Culture and Subculture of Spheroplasts and Fastidious Acid-Fast Bacilli isolated from intestinal tissues. *J Clin Microbiol* **26**: 1600-1603

Mc FADDEN JJ, BUTCHER PD, CHIODINI R, HERMON-TAYLER J (1987): Crohn's disease isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. *J Clin Microbiol* **25**: 796-801

McDONALD WL, RIDGE SE, HOPE AF, CONDRON RJ (1999): Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in young cattle. *Aust Vet J* **77**: 113-119.

MELZAK KA, SHERWOOD CS, TURNER RF, HAYNES CA (1996): Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions. *J. Colloid Interface Sci* **181**: 635-644

MERKAL RS, RHOADES KR, GALLAGHER JE, RICHIE AE (1973): Scanning electron microscopy of mycobacteria. *Am Rev Resp Dis* **108**: 382-387

MERKAL RS, WHIPPLE DL, SACKS JM, SNYDER GR (1987): Prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in ileocecal lymph nodes of cattle culled in the United States. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **190**: 676-80

MILLAR D, FORD J, SANDERSON J, WITHEY S, TIZARD M, DORAN T, HERMON-TAYLOR J (1996): IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole Pasteurized Cows' Milk in England and Wales. *Appl Environ Microbiol* **62**: 3446-3452

MILLER JM, JENNY AL, ELLINGSON JL (1999): Polymerase chain reaction identification of *Mycobacterium avium* in formalin-fixed, paraffin-embedded animal tissues. *J Vet Diagn Invest* **11**: 436-440

MOSER I. (2002): Die Paratuberkulose der Wiederkäuer - eine Gefahr für den Menschen? Vortrag im Rahmen des 2. Leipziger Tierärztekongresses 17. – 19.01.2002

NASER SA, GILLESPIE RF, NASER NA, EL-ZAATARI FA (1998): Effect of IS900 gene of *Mycobacterium paratuberculosis* on *Mycobacterium smegmatis*. *Current Microbiol* **37**: 373-379

NIELSEN SS, BJERRE H, TOFT N (2008): Colostrum and milk as risk factors for infection with *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in dairy cattle. *J Dairy Sci* **91**(12): 4610-5

ODUMERU J, GAO A, CHEN S, RAYMOND M, MUTHARIA L (2001): Use of the bead beater for preparation of *Mycobacterium paratuberculosis* template DNA in Milk. *Can J Vet Res* **65**: 201-205

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES (OIE) (1996): Paratuberculosis (Johne's disease).Chapter 3.1.6.

OLSVIK O, POPOVIC T, SKJERVE E, CUDJOE KS, HORNES E, UGELSTAD J, UHLEN M (1994): Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology. *Clin Microbiol Rev* **7**: 43-54

OTT SL, WELLS, SJ, WAGNER BA (1999): Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Prev Vet Med* **40**: 179-192

PAVLÍK I, BEJCKOVÁ L, PAVLAS M, ROZSYPALOVÁ A, KOSKOVÁ S (1995): Characterization by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization using IS900 of bovine, ovine, caprine and human dependent strains of *Mycobacterium paratuberculosis* isolated in various localities. *Vet Microbiol* **45**: 311-318

PEDERSEN JC, JACOBSEN CS. (1993): Fate of *Enterobacter cloacae* JP120 and *Alcaligenes eutrophus* AEO106(pRO101) in soil during water stress: effects on culturability and viability. *Appl Environ Microbiol.* **59**:1560-4

PILLAI SR, JAYARAO BM (2002): Application of IS900 PCR for Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Directly from Raw Milk. *J Dairy Science* **85**: 1052-1057



PUYANG X, LEE K, PAWLICHUK C, KUNIMOTO DY (1999): IS1626, a new IS900-related *Mycobacterium avium* insertion sequence. *Microbiol* **145**: 3163-3168

REICHEL MP, KITTELBERGER R, PENROSE M, MEYNELL RM, COUSINS D, ELLIS T, MUTHARIA LM, SUGDEN EA, JOHNS AH, DE LISLE GW (1999): Comparison of serological tests and faecal culture for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in cattle and analysis of the antigens involved. *Vet Microbiol* **66**: 135-150

RIEMANN HP und ABBAS B (1983): Diagnosis and control of bovine paratuberculosis (Johne's disease). *Adv. Vet. Sci. Comp Med.* **27**: 481-506

RIJPENS NP, JANNES G, VAN ASBROECK M, ROSSAU R, HERMAN LM (1996) Direct detection of *Brucella* spp. in raw milk by PCR and reverse hybridization with 16S-23S rRNA spacer probes. *Appl Environ Microbiol* **62**(5): 1683-8.

ROSENBERGER G (1978): Krankheiten des Rindes: 2. Aufl., Verlag *Parey*, Berlin, Hamburg: 756-760

ROSSEN L, HOLMSTROM K, OLSEN JE, RASMUSSEN OF (1991): A rapid polymerase chain reaction (PCR)-based assay for the identification of *Listeria monocytogenes* in food samples. *Int J Food Microbiol* **14**: 145-152

ROSSEN L, NORSKOV P, HOLMSTROM K., RASMUSSEN OF (1992): Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int J Food Microbiol* **17**: 37-45

ROWBOTHAM DS, MAPSTONE NP, TREJDOSIEWICZ LK, HOWDLE PD, QUIRKE P (1995): *Mycobacterium paratuberculosis* DNA not detected in Crohn's disease tissue by fluorescent polymerase chain reaction. *Gut* **37**: 660 - 667

RUZANTE JM, SMITH WL, GARDNER IA, THORNTON CG, CULLOR JS (2006): Modified culture protocol for isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from raw milk. *Foodborne Pathog Dis* **3**(4): 457-60

RUZANTE JM, GARDNER IA, CULLOR JS, SMITH WL, KIRK JH, ADASKA JM. (2008): Isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from waste milk delivered to California calf ranches. *Foodborne Pathog Dis* **5** (5): 681-6.

SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T (1989): Molecular cloning - a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA

SANDERSON JD, MOSS MT, TIZARD ML, HERMON-TAYLOR J (1992): *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut* **33**: 890 – 896

SANGUINETTI M, POSTERARO B, ARDITO F, ZANETTI S, CINGOLANI A, SECHI L, DE LUCA A, ORTONA L, FADDA G (1998): Routine use of PCR-Reverse Cross-Blot Hybridization Assay for rapid identification of *Mycobacterium* species growing in liquid media. *J Clin Microbiol* **36**: 1530-1533

SCHEU PM, BERGHOF K, STAHL U (1998): Detection of pathogenic and spoilage micro-organisms in food with the polymerase chain reaction. *Food Microbiol* **15**: 13-31

SINGH SV, SINGH PK, SINGH AV, SOHAL JS, SUBODH S, NARAYANASAMY K. (2007): Non-chemical method of DNA recovery and characterization of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using IS 900 PCR. *Indian J Exp Biol* **45**(9): 812-6

SMITHWICK RW, BIGBIE MR, FERGUSON B, KARLIX A, WALLIS CK (1995): Phenolic acridine orange fluorescent stain for mycobacteria. *J Clin Microbiol* **33**: 2763-2764

SOCKETT D. C., CONRAD T. A., THOMAS C. B., COLLINS M. T. (1992a): Evaluation of four serological tests for bovine *paratuberculosis*. *J Clin Microbiol* **30**: 1134-1139

SOCKETT DC, CARR DJ, COLLINS MT (1992b): A repository of specimens for comparison of diagnostic testing procedures for bovine paratuberculosis. *J Vet Diagn Invest* **4**: 188-191

SPAHR U, SCHAFROTH K (2001): Fate of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss Hard and Semihard Cheese manufactured from raw Milk. *Appl Env Microbiol* **67**: 4199-4205

STABEL JR (1998): Johne's disease: a hidden threat. *J Dairy Sci* **81**: 283 - 288

STABEL JR, WELLS SJ, WAGNER BA (2002): Relationships Between Fecal Culture, ELISA, and Bulk Tank Milk Test Results for Johne's Disease in US Dairy Herds. *J Dairy Sci* **85**: 525-531

STOBBE, BAUMANN (Hrsg.): Innere Medizin, Grundlagen und Klinik innerer Krankheiten. Siebte Auflage. *Verlag Ullstein Mosby*, 1996

STREETER R, HOFFSIS G, BECH-NIELSEN S, SHULAW W, RINGS D (1995): Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. *Am J Vet Res* **56**: 1322-1324

SUGDEN EA, CORNER AH, SAMAGH BS, BROOKS BW, TURCOTTE C, NIELSEN KH, STEWART RB, DUNCAN JR (1989): Serodiagnosis of ovine paratuberculosis, using lipoarabinomannan in an enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Vet Res* **6**: 850-854

SUGDEN EA, SAMAGH BS, BUNDLE DR, DUNCAN JR (1986): Lipoarabinomannan and lipid-free arabinomannan antigens of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Infect Immun* **55**: 762-770

SWEENEY RW, WHITLOCK RH, BUCKLEY CL, SPENCER P, ROSENBERGER AE, HUTCHINSON LJ (1994): Diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle, using enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *Am J Vet Res* **55**: 905-909

SWEENEY RW, WHITLOCK RH, ROSENBERGER AE (1992): *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J Clin Microbiol* **30**: 166-171

TANAKA K, WILKS M, COATES PJ, FARTHING MJ, WALKER-SMITH JA, TABAQCHALI S (1991): *Mycobacterium paratuberculosis* and Crohn's disease. *Gut* **32**: 43-45

THAYER WR, COUTU JA, CHIODINI RJ, VAN KRUININGEN HJ, MERKAL RS (1984): The possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. II. Mycobacterial antibodies in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* **29**: 1080-1085

TIWARI A, VANLEEUEWEN JA, DOHOO IR, KEEFE GP, WEERSINK A. (2008): Estimate of the direct production losses in Canadian dairy herds with subclinical *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection. *Can Vet J.* **49**(6): 569-76

TRUANT J. P., BRETT W. A., THOMAS W. (1962): Fluorescence microscopy of tubercle bacilli stained with auramine and rhodamine. *Henry Ford Hosp Med Bull* **10**: 287-296

TWORT, INGRAM (1912): A method for isolation and cultivating *Mycobacterium enteritidis chronicae pseudotuberculosis bovis johne* and some experiments on the preparation of a diagnostic vaccine for pseudotuberculosis enteritis of bovines. *Proc Roy Soc London* **84**: 517-543

VANNUFFEL P, GILOT P, LIMBOURG B, NAERHUYZEN B, DIETERICH C, COENE M, MACHTELINCKX L, COCITO C (1994): Development of species-specific enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of Johne's disease in cattle. *J Clin Microbiol*, **32**: 1211-1216

WADDELL LA, RAJIĆ A, SARGEANT J, HARRIS J, AMEZCUA R, DOWNEY L, READ S, MCEWEN SA (2008): The zoonotic potential of *Mycobacterium avium* spp. *paratuberculosis*: a systematic review. *Can J Public Health.* **99**(2):145-55

WALL S, KUNZE ZM, SABOOR S, SOUFLERI I, SEECHURN P, CHIODINI R, MCFADDEN JJ (1993): Identification of spheroplast-like agents isolated from tissues of patients with Crohn's disease and control tissues by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **31**: 1241 - 1245

WANG R, CAO W, FRANKLIN W, CAMPBELL W, CERNIGLIA CE (1994): A 16S rDNA-based PCR method for rapid and specific detection of *Clostridium perfringens* in food. *Mol Cell Probes* **8**: 131-138

WANG R, CAO W, JOHNSON MG (1992): 16S rRNA-based probes and polymerase chain reaction method to detect *Listeria monocytogenes* cells added to foods. *Appl Env Microbiol* **58**: 2827–2831

WELLS SJ, OTT SL, SEITZINGER AH (1998): Key health issues for dairy cattle – new and old. *J Dairy Sci* **81**: 3029-3035

WEYANT RS, EDMUNDS P, SWAMINATHAN B (1990): Effect of ionic and non-ionic detergents on the *Taq* polymerase. *BioTechniques* **9**: 308-309

WHEELER, PR, RATLEDGE C (1994): Metabolism of *Mycobacterium paratuberculosis* in : B.R. BLOOM (Hrsg): Tuberculosis pathogenesis, protection and control. *ASM Press, Washington, DC*: 360-363

WHIPPLE DL, CALLIHAN DR, JARNAGINN JL (1991): Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine faecal specimens and a suggested standardized procedure. *J Vet Diag Inv* **3**: 368-373

WHIPPLE DL, KAPKE P, VARY C (1987): Identification of restriction fragment length polymorphism in DNA from *Mycobacterium paratuberculosis*. *J Clin Microbiol* **28**, 2561-2564

WHITTINGTON RJ, MARSH I, TURNER J, McALLISTER S, CHOY E, EAMENS GJ, MARSHALL DJ, OTTAWAY S (1998): Rapid Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in Clinical Samples from Ruminants and in Spiked Environmen-

tal Samples by Modified BACTEC 12B Radiometric Culture and Direct Confirmation by IS900 PCR. *J Clin Microbiol* **36**: 701-707

WIDJOJOATMODJO MN, FLUIT AC, TORENSMA R, KELLER BH, VERHOEF J (1991): Evaluation of the magnetic immuno PCR assay for rapid detection of *Salmonella*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **10**: 935-938

WIEDBRAUK DL, WERNER JC, DREVON AM (1995): Inhibition of PCR by aqueous and vitreous fluids. *J Clin Microbiol* **33**: 2643-2646

IS900 PCR. *J Clin Microbiol* **36**(3), 701-707

WILSON DJ, ROSSITER C, HAN HR, SEARS PM (1993): Association of *Mycobacterium paratuberculosis* infection with reduced mastitis, but with decreased milk production and increased cull rate in clinically normal dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* **54**: 1851-1857

WINTERHOFF C (2000): Paratuberkulose-Diagnostik in Milch: Erreger- und Antikörpernachweis mittels PCR und ELISA. *Doktorarbeit an der Tierärztlichen Hochschule Hannover*: S. 46

YOKOMIZO Y, NISHIMORI I, KISHIMA M, YUGI H (1988): Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. A proposal of replacing the complement fixation test with the ELISA as the official diagnostic test for paratuberculosis in Japan. *Proceedings of 2<sup>nd</sup> Int. Coll. Paratubercul.*, Maisons-Alfort, France: 206-214

ZWEITER      BERICHT      ZUR      TIERSEUCHENBEKÄMPFUNG      UND  
TIERGESUNDHEIT im Freistaat Thüringen, Hrg.: Thüringer Ministerium für Soziales, Familie und Gesundheit, Kap. 8.2.2 und 9.1

## 8. Anhang

### 8.1. Sequenz IS900

LOCUS MPIS900A 1451 bp DNA BCT 10-FEB-1999

DEFINITION *Mycobacterium paratuberculosis* insertion element IS900.

ACCESSION X16293

VERSION X16293.1 GI:44488

KEYWORDS insertion element; insertion element IS900.

SOURCE *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

ORGANISM *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*  
 Bacteria; Firmicutes; Actinobacteria; Actinobacteridae;  
 Actinomycetales; Corynebacterineae; Mycobacteriaceae;  
 Mycobacterium.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1451)

AUTHORS Green,E.P.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (24-AUG-1989) Green E.P., Dept of Surgery, St George's  
 Hospital Medical School, Cranmer Terrace, Tooting, London SW17 0RE,  
 UK

REFERENCE 2 (bases 1 to 1451)

AUTHORS Green,E.P., Tizard,M.L., Moss,M.T., Thompson,J., Winterbourne,D.J.,  
 McFadden,J.J. and Hermon-Taylor,J.

TITLE Sequence and characteristics of IS900, an insertion element  
 identified in a human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium*  
*paratuberculosis*

JOURNAL Nucleic Acids Res. 17 (22), 9063-9073 (1989)

MEDLINE 90067910

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1451  
 /organism="Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis"  
 /strain="Ben"  
 /db\_xref="taxon:1770"

RBS 226..230  
 /note="pot.ribosome binding site"

CDS 236..1435  
 /note="open reading frame 1197 (AA 1-399)"  
 /codon\_start=1  
 /transl\_table=11  
 /protein\_id="CAA34361.1"  
 /db\_xref="GI:581350"  
 /db\_xref="SWISS-PROT:P14322"

```

/translation="MAQPVWAGVDAGKADHYCMVINDDAQRLLSQRVANDEAALLELI
AAVTTLADGGEVWTAIDLNAGGAALLIALLIAAGQRLLYIPGRTVHHAAGSYRGEKGT
DAKDAAIIADQARMRHDLPPLRAGDDIAVELRIITSRRSDLVADRTRAIEPNARPAAG
ILSALERAFDYNKSRAALILLTGYQTPDALRSAGGARVAAFLRKRKARNADTVAAATAL
QAANAQHSIVPGQQLAATVVARLAKEVMALDTEIGDTDAMIEERFRRHRHAEIILSMP
GFGVILGAEFLAATGGDMAAFASADRLAGVAGLAPVPRDSGRISGNLKRPRRYDRRL
RACYLSALVSIRTDPSRTYYDRKRTEGKRHTQAVLALARRRLNVLWAMLRDHAVYHP
ATTTAAA"

```

BASE COUNT        252 a        498 c        453 g        248 t

ORIGIN

```

   1 tccttacctt tcttgaaggg tggtcggggc cgtcgcttag gcttcgaatt gcccgaggac
  61 gtcgggtatg gctttcatgt ggttgctgtg ttggatggcc gaaggagatt ggccgcccgc
121 ggtcccgcca cgactcgacc gctaattgag agatgcgatt ggatcgctgt gtaaggacac
181 gtcggcgctg tcgtctgctg ggttgatctg gacaatgacg gttacggagg tggttggtggc
241 acaacctgtc tgggcggggc tggacgcggc taaggccgac cattactgca tggttattaa
301 cgacgacgcg cagcgattgc tctcgacgcg ggtggccaac gacgaggccg cgctgctgga
361 gttgattgcg gcggtgacga cgttggccga tggaggcgag gtcacgtggg cgatcgacct
421 caacgccggc ggcgccgctg tgctgatcgc cttgctcatc gctgccgggc agcggtgctg
481 ttatatcccc gggcgcacgg tccatcacgc cgcggttagt taccgcgggc aaggcaagac
541 cgacgcaaaa gacgctgcca tcatcgccga tcaggcccgg atgcgccacg acttgacgcc
601 tctgcgcgcc ggcgatgaca tcgcagtcga gctgcgcac ctagaccagc gacgttccga
661 tctggtggct gatcggaacc gggcgatcga accgaatgcg cgcccagctg ctggaatact
721 ttcggcgctg gaacgcgcct tcgactacaa caagagccgt gccgcgctga tcctgcttac
781 tggctaccaa actcccgcgc cgctgcgcag cgccggtggc gctcgagtag ccgcgttctt
841 gcgtaaacgc aaggcccgca acgccgatac cgtcgacgcc accgcgctgc aggcgcgtaa
901 cgcccaacac agcatcgctc ccggccaaca actggcgggc actgtggtgg ccgcgcctggc
961 caaggaggtg atggccctcg acaccgaaat cggcgacacc gacgcgatga tcgaggagcg
1021 atttcgccgc caccgccacg ccgaaatcat cctgagcatg ccgggattcg gcgtcatcct
1081 gggcgctgag ttcttcgccg ccaccggcgg ggacatggcc gcattcgcct ccgccgaccg
1141 cctcgccggc gtcgccggcc tggcgccggt accacgagat tccggccgca tcagcgga
1201 cctcaaacgc ccccgacgct acgaccggcg cctgctgcgc gcctgctacc tgctggcctt
1261 ggtcagcatc cgcaccgacc cctcctcgcg cacctactac gaccgaaaac gcaccgaagg
1321 aaaacgccac acccaagccg tcctcgccct ggcccgcgcg gcctcaacg tcctgtgggc
1381 catgctgcgc gaccacgctg tctaccacc cgaaccact accgcggcgg cttgacaacg
1441 tcattgagaa t

```



## 8.2. Vektor

### pFORCE-1 Vector

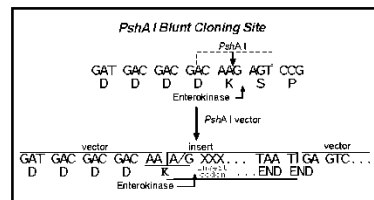
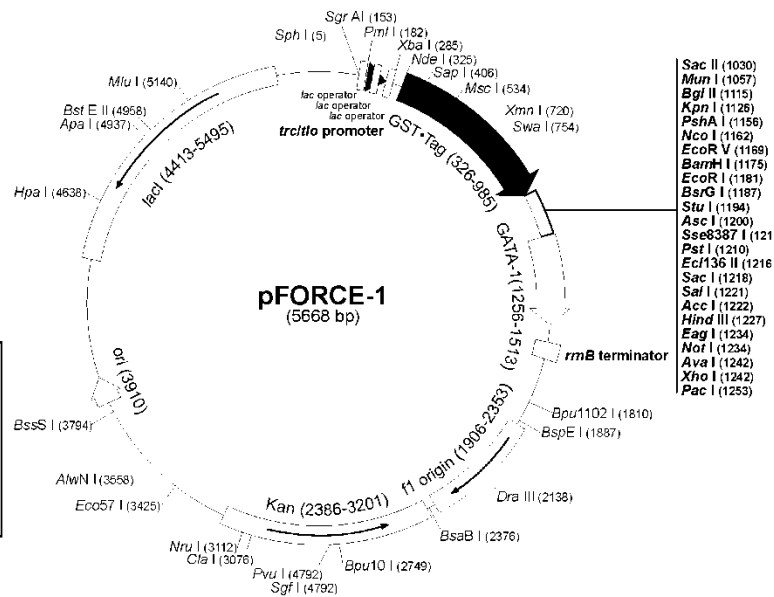
TB292 02/01

	Cat. No.
pFORCE-1 Vector (uncut)	70948-3
pFORCE-1 Blunt Vector	70989-3

#### pFORCE-1 sequence landmarks

<i>trc/tlo</i> promoter	225-253
<i>trc/tlo</i> transcription start	260
GST•Tag™ coding sequence	326-985
His•Tag™ coding sequence	1008-1025
S•Tag™ coding sequence	1068-1112
Multiple cloning sites ( <i>Sac</i> II <i>Pac</i> I)	1030-1253
GATA-1 coding sequence	1256-1513
<i>rmB</i> terminator	1551-1751
<i>lacI</i> coding sequence	4413-5495
pUC origin	3910
Kan coding sequence	2386-3201
f1 origin	1906-2353

The pFORCE™ 1 vector is designed for positive selection of recombinants and to facilitate the expression of cloned inserts as GST•Tag™ fusion proteins. Positive selection is based on the toxicity created in *E. coli* when the mouse GATA 1 transcription factor is expressed as a GST GATA fusion protein. Plasmids carrying inserts that disrupt expression of the downstream GATA protein prevent toxicity and can be selected in the presence of IPTG. The f1 origin is oriented so that infection with helper phage will produce virions containing single stranded DNA that corresponds to the coding strand shown below. Therefore, single stranded sequencing should be performed using the GATADOWN primer (Cat. No. 70966-3). Vector encoded sequences can be completely removed when cloning into the *Pst*HA I site (as shown below) by cleaving the GST•Tag fusion protein with enterokinase.



GTGACATCATAACGGTTCTGCAGAAATATTCTGAAATGAGCTGTGACATTGTGAGCGGATAACAATTAATGTGGAAATTGTGAGCGGATAACAATTC  
 Xba I Nde I GST•Tag  
 COCTCTAGAAATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTCCTCCCTATACTAGGTTAT... 606 bp... TTTGGTGGTGGCGACCATCCT  
 MetSerProIleLeuGlyTyr... 202 aa... PheGlyGlyAspHisPro  
 His•Tag Sac II Mun I  
 CCAAAATCGGATGGTTCAACTAGTGGTTCTGGTCATCACCATCACCATCACTCCGCGGCTCTGGTCCACGCGGTAGTACTGCAATTGGTATGAAGAA  
 ProLysSerAspGlySerThrSerGlySerGlyHisHisHisHisHisSerAlaGlyLeuValProArgGlySerThrAlaIleGlyMetLysGlu  
 S•Tag S•Tag 18mer primer #70828-3 thrombin I  
 ACCGCTGCTGCTAAATTCGACGCCAGCACATGGACAGCCAGATCTGGTACCGGTGGTGGCTCCGGTGATGACGACGACAGAGTCCCATGGATATC  
 ThrAlaAlaAlaLysPheGluArgGlnHisMetAspSerProAspLeuGlyThrGlyGlyGlySerGlyAspAspAspLysSerProMetAspIle  
 enterokinase  
 BamH I EcoR I BsrG I Stu I Asc I Sse8387 I Pst I Ecl136 II Acc I Sal I Hind III Eag I Acl I Xho I Pac I GATA  
 GGGGATCCGAATTCGTACAGGCTTGGCGCGCTTCAGCGGAGCTCCGTCGACAAAGCTTGGCGCGCACTCGAGTTAATTAAATACCGGTAATAAATA  
 GlyAspProAsnSerValGlnAlaLeuAlaArgLeuGlnAlaSerSerValAspLysLeuAlaAlaAlaLeuGluLeuIleAsnThrGlyAsnLysLeu  
 GTTCTGGTTCGGGTGGTTCCAAACGGGCGAGCCCAATGCACCTAACTGTCAAACG  
 ValLeuValProArgGlySerLysArgAlaGlyThrGlnCysThrAsnCysGlnThr  
 GATADOWN primer #70966-3

pFORCE-1 cloning/expression region

## pFORCE-1 Restriction Sites

TB292 02/01

Enzyme	# Sites	Locations	Enzyme	# Sites	Locations	Enzyme	# Sites	Locations
AccI	1	1222	EagI	1	1234	SfaNI	17	
AcII	69		EarI	3	406 2953 5523	Sfcl	4	1206 1912 3511 3702
AlfIII	3	565 3967 5140	Ecl136II	1	1216	SgfI	1	2771
AluI	21		Eco47III	3	71 169 4238	SgrAI	1	153
Alw26I	5	2749 4525 4912 5038 5443	Eco57I	1	3425	SpeI	2	993 1268
AlwI	10	1170 1183 1359 2511 2906	EcoNI	3	337 2856 5608	SphI	1	5
		3321 3323 3409 4359 5584	EcoO109I	3	40 359 1837	Sse8387I	1	1210
AlwNI	1	3558	EcoRI	1	1181	SspI	3	208 2343 2844
ApaI	1	4937	EcoRII	12		StuI	1	1194
ApaLI	2	3653 5160	EcoRV	1	1169	StyI	3	1162 1195 1832
ApoI	7	1086 1181 2318 2329 2968	EheI	4	17 131 152 4503	Swal	1	754
		3152 4865	FauI	15		TaiI	15	
AscI	1	1200	Fnu4HI	32		TaqI	18	
AvaI	1	1242	FokI	11		TfiI	9	1441 1501 2536 2627 2799
AvaII	4	821 4125 4213 4589	HaeII	12				2855 3993 4160 4462
BamHI	1	1175	HaeIII	29		ThaI	32	
BanI	11		HgaI	10	804 1699 1913 3277 3855	TseI	15	
BanII	6	82 96 1218 2064 3118			4913 4919 5148 5193 5592	Tsp45I	6	182 1509 1957 2617 4130
		4937	HhaI	42				4958
BbsI	3	4281 4655 4994	HincII	3	226 1223 4638	Tsp509I	29	
BbvI	15		HindIII	1	1227	TspRI	12	
BcgI	4	357 1246 4320 4820	HinfI	18		VspI	4	1252 2568 4398 4457
BclI	2	761 5126	HpaI	1	4638	XbaI	1	285
BfaI	8	286 339 994 1269 1821	HphI	21		XcmI	3	4755 4773 5289
		1982 3167 3474	KpnI	1	1126	XhoI	1	1242
BglII	1	1115	MaeIII	14		XmnI	1	720
BpmI	3	4185 4819 5308	MboII	15				
Bpu10I	1	2749	MluI	1	5140	Enzymes that do not cut pFORCE-1:		
Bpu1102I	1	1810	MnlI	24		AatII	AflII	AhdI
BsaAI	2	182 2135	MscI	1	534	AvrII	BglI	
BsaBI	1	2375	MseI	27		Bst1107I	Bsu36I	
BsaHI	6	16 130 151 1691 4502	MslI	4	421 4774 4804 5092	FseI	FspI	NheI
		5185	MspA1I	9	1029 1077 1360 1809 3384	RsrII	SanDI	SexAI
BsaJI	10	29 35 1027 1162 1195			3629 4451 4544 5114	SnaBI	SrfI	SunI
		1832 2492 2894 3807 4505	MspI	26				Tth111I
BsaWI	10	1125 1137 1257 1367 1887	MunI	1	1057			
		2630 3614 3761 4318 4821	MwoI	34				
BsgI	3	613 5095 5295	NarI	4	16 130 151 4502			
BsiEI	5	1237 2771 3633 4057 4361	NciI	9	31 1639 1672 2895 3590			
BsiHKAII	4	1218 3657 5164 5648			4369 4714 5523 5574			
BsII	25		NcoI	1	1162			
BsmBI	2	2749 4525	NdeI	1	325			
BsmFI	5	11 314 1144 1916 4138	NgoAIV	2	2030 4242			
BsmI	3	1358 2810 2887	NlaIII	25				
Bsp1286I	9	82 96 1218 2064 3118	NlaIV	25				
		3657 4937 5164 5648	NotI	1	1234			
BspEI	1	1887	NruI	1	3112			
BspLU11I	2	565 3967	NsiI	2	2657 2923			
BsrBI	6	237 268 618 1644 1991	NspI	3	5 569 3971			
		4038	NspV	2	724 1090			
BsrDI	3	1382 4733 5099	PacI	1	1252			
BsrFI	7	153 1125 1257 2030 2811	PfIMI	3	1103 2509 5565			
		4242 5454	PinAI	2	1125 1257			
BsrGI	1	1187	PleI	9	1165 2191 2199 2536 3591			
BsrI	17				4076 4711 5507 5594			
BssHII	2	1200 4729	PmlI	1	182			
BssSI	1	3794	PshAI	1	1156			
BstEII	1	4958	PspT406I	4	1654 2348 4112 5480			
BstXI	3	5094 5217 5346	PstI	1	1210			
BstYI	8	1115 1175 1364 2516 3315	PvuI	1	2771			
		3326 4364 5576	PvuII	2	4451 4544			
Cac8I	46		RcaI	2	74 3247			
Clal	1	3076	RsaI	6	900 1052 1124 1189 2934			
CriJI	82				4997			
DdeI	8	693 1564 1620 1810 2749	SacI	1	1218			
		3284 3693 4569	SacII	1	1030			
DpnI	19		Sall	1	1221			
DraI	2	754 863	SapI	1	406			
DraIII	1	2138	Sau3AI	19				
DrdI	2	2182 3865	Sau96I	14				
DsaI	3	35 1027 1162	Scal	2	900 1052			
EaeI	4	32 532 1234 4466	ScrFI	21				

### 8.3. Material

#### 8.3.1. Geräte

##### Zentrifugen:

Centrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Sigma 3K30	Fisher Scientific, Schwerte

##### Rotoren:

A-4-62	Eppendorf, Hamburg
FA 45-30-11	Eppendorf, Hamburg
F45-24-11	Eppendorf, Hamburg
12150-H	Fisher Scientific, Schwerte
12154-H	Fisher Scientific, Schwerte

##### Sonstige:

BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Blot-Apparatur	BioRad, Hercules, USA
Brutschrank	Heraeus, Osterode
Gel Dryer, Model 583	BioRad, Hercules, USA
Gelkammern	BioRad, Hercules, USA
GeneAmp 5700	Applied Biosystems, USA
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Heizplatte	IKA, Staufen im Breisgau
Magnetrührer	IKA, Staufen im Breisgau
Magnetständer	Dynal Biotech, Norwegen
MastercyclerGradient	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop	Zeiss, Jena
Mikrowelle	Bauknecht, Deutschland
Multitube- Reagenzglasschüttler 4010	Corning, USA..
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim/Main

Personal Computer und Software	fzmb-diagnostik, Erfurt
pH-Meter	Mettler, Gießen
Pipetboy	witeg, Germany
Pipetten (20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Powersupplier	BioRad, Hercules, USA
Ribolyser	Hybaid, Ashford. UK
Schwenkplatte Certomat U	Braun, Melsungen
Sterilbank	HERASafe, Heraeus, Osterode
Ultraschall-Homogenisator	Bandelin, Berlin
Vortex Genie	Bender Hohbein AG
Waagen	Sartorius, Göttingen

### 8.3.2. Verbrauchsmaterialien

Einmalhandschuhe	Ansell, USA
Einmalküvetten (1 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Einmalspritzen (1-50 ml)	Braun, Melsungen
Filter (0,45 µm Porengröße)	Sarstedt, Nümbrecht
Glasperlen 2,85-3,3 mm	Roth, Karlsruhe
MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate	Applied Biosystems, USA
MicroAmp Optical Caps	Applied Biosystems, USA
Optical Adhesive Cover	ABI Prism, USA
Parafilm M	Schütt, Göttingen
PCR-Reaktionsgefäße	Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen	Roth, Karlsruhe
PS-Röhrchen, 3 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Schraubkappenflasche mit Teflon-Dichtungen	Suppelco, Taufkirchen
Spectra Por® Float-A-Lyzer®	Roth, Karlsruhe
Sterilfilter (0,20 µm)	Sarstedt, Nümbrecht
UV Küvette (UVette®)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht

**8.3.3. Chemikalien**

Sofern nicht anders angegeben besitzen die aufgeführten Chemikalien den Reinheitsgrad p. a.

Aceton	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumhydroxid, 5 M	Sigma, Deisenhofen
BCIP	Roth, Karlsruhe
Borsäure	Roth, Karlsruhe
Calciumchlorid	Roth, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
CTAB	Roth, Karlsruhe
Diethylether	Sigma, Deisenhofen
di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Dimethylformamid	Roth, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Dynal-M280 Beads, Prod.Nr. 142.04	Dynal Biotech, Norwegen
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure 100 %	Roth, Karlsruhe
Ethanol > 99,8 %	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Formamid	Roth, Karlsruhe
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycogen	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Guanidinium-Thiocyanat	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Roth, Karlsruhe

---

Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Labferment	Roth, Karlsruhe
Lipase	Sigma, Deisenhofen
Lithiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magermilchpulver	Humana, Herford
Magnesiumacetat	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Magnesiumsulfat	Fluka, Deisenhofen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natrium-Citrat	Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe
NBT	Roth, Karlsruhe
n-Hexan	VEB Berlin Chemie, Berlin
Petroleumether	Sigma, Deisenhofen
Pufferstandardlösung pH 4	Fluka, Deisenhofen
Pufferstandardlösung pH 7	Fluka, Deisenhofen
Pufferstandardlösung pH 9	Fluka, Deisenhofen
Roti-Histokit II	Roth, Karlsruhe
Roti-Phenol	Roth, Karlsruhe
Roti-Phenol/Chloroform	Roth, Karlsruhe
Rubidiumchlorid	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
SDS	Roth, Karlsruhe

---

Sodium-N-Lauroylsarcosine	USB, USA
Tb-color Karbolfuchsinlösung	Merck, Darmstadt
Tb-color Malachitgrün (Oxalat)-Lösung	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Triton X 100	Roth, Karlsruhe
Tween 80	Roth, Karlsruhe
Zirkonium (IV) Chlorid	Merck, Darmstadt

#### Nährmedien und Zusätze

Herold's egg yolk medium	BD, Heidelberg
Middlebrook Agar 7H10	BD, Heidelberg
Middlebrook Bouillion 7H9	BD, Heidelberg
Mycobactin J	Synbiotics, Lyon
OADC-Anreicherung	BD, Heidelberg

#### Enzyme/PCR Chemie

DNA Ladder	Roth, Karlsruhe
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
RNase A	Roth, Karlsruhe
SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, USA
Taq-DNA-Polymerase	Eppendorf, Hamburg
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, USA

#### Kits

E.Z.N.A. Tissue Kit	Peqlab, Erlangen
Invisorb Cell Spin Mini Kit	Invitek, Berlin
NucleoSpin Food Kit	Macherey-Nagel, Düren
direct universal Dynal Beads Kit	Invitrogen, Karlsruhe
DNA Purification System for Food	Promega, Mannheim
Mikrobank™ - Röhrchen	Roth, Karlsruhe
peqGOLD Gelpure Kit	Peqlab, Erlangen

### 8.3.4. Organismen und Antikörper

<i>Mycobacterium paratuberculosis</i> , DSM 44133	DSMZ, Braunschweig
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i> , DSM 44135	DSMZ, Braunschweig
<i>Mycobacterium paratuberculosis</i> , "JENA"	Dr. G. Martin, Jena

$\alpha$ -LAM, CS-35, IgG3	J.T. Belisle, NIH, Colorado State University
Erdman LAM, CS-40, IgG1	J.T. Belisle, NIH, Colorado State University

### 8.3.5. Primer

Primer für die Amplifikation eines 563 bp-Fragmentes von IS900 aus *Mycobacterium paratuberculosis* [ENGLUND *et al.*, 1999].

Name:	Stina-204F
Sequenz:	5'-TGATCTGGACAATGACGGTTACGGA-3'
Name:	Stina-749R
Sequenz:	5'-CGCGGCACGGCTCTTGTT-3'

Primer für die Amplifikation eines 210 bp-Fragmentes von IS900 aus *Mycobacterium paratuberculosis* [ENGLUND *et al.*, 1999].

Name:	Stina Nest-347F
Sequenz:	5'-GCCGCGCTGCTGGAGTTGA-3'
Name:	Stina Nest-556R
Sequenz:	5'-AGCGTCTTTGGCGTCGGTCTTG-3'

Primer für die Amplifikation eines 76 bp-Fragments mit dazwischen liegender TaqMan Sonde von IS900 aus *Mycobacterium paratuberculosis* [diese Arbeit].

Name:	IS900-710F
Sequenz:	5'-ATGCAGTAATGGTCGGCCTTAC-3'
Name:	IS900-785R
Sequenz:	5'-TGACGGTTACGGAGGTGGTT-3'
Name:	IS900-740T TaqMan Sonde
Sequenz:	5'-ACGCCCCGCCAGACAGGTTGT-3'



Primer für die Amplifikation eines 969 bp-Fragments (IS900 Gesamt) aus *M. paratuberculosis* zur Klonierung in den pFORCE-1 Vektor [diese Arbeit].

Name: IS900-58F

Sequence: 5'-GGACGTCGGGTATGGCTTTCA-3'

Name: IS900-1026R

Sequence: 5'-ATTACGAAATCGCTCCTCGATCA-3'

Primer für die Amplifikation der Multiple Cloning Site des pFORCE-1 Vektor zur Überprüfung der Klonierung [NOVAGEN, Bad Soden/Ts., 2001]

Name: pFORCE S-Tag 18mer

Sequenz: 5'-GAACGCCAGCACATGGACA-3'

Name: pFORCE GATADOWN

Sequenz: 5'-CGTTTGACAGTTAGTGCATTG-3'

Zur Lage der Primer im Vektor siehe 6.3./pFORCE – cloning/expression region.

Primer für die Amplifikation eines 279 bp-Fragmentes der 16 S rRNA von *Clostridium perfringens* zu Überprüfung der verwendeten DNA bei der Spezifitätsprüfung [WANG *et al.*, 1994].

Name: CP.1

Sequenz: 5'-AAAGATGGCATCATCATTCAAC-3'

Name: CP.2

Sequenz: 5'-TACCGTCATTATCTTCCCCAAA-3'

Primer für die Amplifikation eines 193 bp-Fragmentes der 16 S rRNA von *Mycobacterium avium* subsp. *avium* zur Überprüfung der DNA der verwendeten DNA bei der Spezifitätsprüfung [MILLER *et al.* 1999].

Name: MA16SrRNA-L

Sequenz: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

Name: MA16SrRNA-R

Sequenz: 5'-ACCAGAAGACATGCGTCTTG-3'

### 8.3.6. Größenstandards

DNA-Marker pBR328 Mix I, Roth, Kat.-nr.: T146.1

Fragmentgrößen (in bp): 2176, 1766, 1230, 1033, 653, 517, 453, 394, 298, 298, 234, 220, 154, 154

100 bp-Leiter Extended, Roth, Kat.-nr.: T835.1

Fragmentgrößen (in bp): 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 500, 400, 300, 200, 150, 100

Generuler DNA Ladder Mix, MBI Fermentas, Kat.-nr.: SM033.1

Fragmentgrößen (in bp): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100

Prestained Protein Marker, BioLabs, Kat.-nr. P7708S

Größe in kDa: 175, 83, 62, 48, 33, 25, 17, 7

### 8.4. Abkürzungen

A	Adenin
AG	Agargemeinschaft
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CTAB	<u>C</u> etyl <u>t</u> rimethylammonium <u>b</u> romid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid)
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat

---

ds	doppelsträngig
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
fg	femtogramm
g	Erdbeschleunigung
G	Guanosin
GTC	Guanidinthiocyanat
h	Stunde ( <i>hour</i> )
Wasser <sub>UV</sub>	deionisiertes Wasser, 15 min UV-Bestrahlte bei 302 nm
IMB	Immunomagnetische Beads
IMS	Immunomagnetische Separation
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
Kit	Box mit allen Komponenten, die man für einen Versuch braucht
l	Liter
LB	Luria-Bertani
μ	mikro
m	milli
M	Mol/Liter
MAP	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>
NAC	Amplifikationskontrolle ( <i>No amplification control</i> )
min	Minute
NTC	Negativkontrolle ( <i>No template control</i> )
MVA	Milchviehanlage
MW	Molekulargewicht
n	nano
NBT	Nitroblautetrazolium
NC-Membran	Nitrocellulose Membran
neg.	negativer Befund
OD	Optische Dichte
ORF	Offenes Leseraster ( <i>open reading frame</i> )

---

p	pico
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pg	pikogramm
pos.	Positiver Befund
RNA	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rotations per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
sec	Sekunde ( <i>second</i> )
SSC	Natriumchlorid-Natriumcitrat-Puffer ( <i>sodium chloride sodium citrate buffer</i> )
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TGD	Tiergesundheitsdienst
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
U	Einheit ( <i>unit</i> )
U	Uracil
UNG	Uracil N-glycosylase
V	Volt
v/v	Volumenprozent ( <i>Volume to Volume</i> )
w/v	Gewichtsprozent ( <i>Weight per Volume</i> )

## Danksagung

Beim fzmb GmbH, Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie bedanke ich mich für die Chance, eine Dissertation zu verfassen.

Besonders danken möchte ich Prof. Dr. Johannes Wöstemeyer für das Vertrauen und die Möglichkeit zur Dissertation.

Der Abteilung *veterinärmedizinische Diagnostik* am fzmb GmbH danke ich für die vielfältige Unterstützung.

Insbesondere danke ich Jörg Riediger für seine Geduld Geräte in Kühlschränke einzupassen und Dinge zu reparieren.

Für technische Assistenz danke ich Yvonne Eberhardt und Kerstin Ullrich.

Mit Wulf-Iwo Bock konnte ich meine Ergebnisse diskutieren, herzlich Dank für die Anregungen und die „tierärztliche Sicht“ der Dinge.

Dr. Allhard Hoffmann hat mir bei den Berechnungen der Plasmidkonzentrationen geholfen. Vielen Dank.

Dr. Ellen Kaminski hat mich bei der Korrektur der englischsprachigen Zusammenfassung unterstützt – herzlichen Dank dafür.

Der Tierärztin Erika Bacher und den Mitarbeitern der Agargenossenschaft Rottorf danke ich für die Möglichkeit und die Unterstützung beim Sammeln von Proben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir durch ihre Unterstützung meine Arbeit erst ermöglicht hat.

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe und in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt habe.

Die geltende Promotionsordnung der Fakultät ist mir bekannt. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen, Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.